



UNIVERSIDAD DE MURCIA

ESCUELA INTERNACIONAL DE DOCTORADO

Caracterización Fenotípica, Fisiológica y Molecular de
la Respuesta a Salinidad y Sequía en Tomate Cultivado
(*Solanum lycopersicum*) y Silvestre (*S. pennellii*).

D^a Irene Albaladejo Carrasco

2018



CSIC

CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS

ESCUELA INTERNACIONAL DE DOCTORADO

Caracterización fenotípica, fisiológica y molecular de la respuesta a salinidad y sequía de tomate cultivado (*Solanum lycopersicum*) y silvestre (*Solanum pennellii*).

Tesis Doctoral

D^a. Irene Albaladejo Carrasco

Directores de la Tesis

Dr. Francisco Borja Flores Pardo

Dra. M^a Isabel Egea Sánchez

2018



D. Francisco de Borja Flores Pardo, Científico Titular del Consejo Superior de Investigaciones Científicas, con destino en el Centro de Edafología y Biología Aplicada del Segura, AUTORIZA:

La presentación de la Tesis Doctoral titulada "Caracterización fenotípica, fisiológica y molecular de la respuesta a salinidad y sequía en tomate cultivado (*Solanum lycopersicum*) y silvestre (*S. pennellii*)" realizada por D^a. Irene Albaladejo Carrasco, bajo mi inmediata dirección y supervisión, y que presenta para la obtención del grado de Doctor por la Universidad de Murcia.

En Murcia, a 17 de abril de 2018

Fdo. Francisco Borja Flores



D^a. María Isabel Egea Sánchez, Doctora en Ciencia y Tecnología de los Alimentos por la Universidad de Murcia y Contratada Post-doctoral en el Centro de Edafología y Biología Aplicada del Segura, AUTORIZA:

La presentación de la Tesis Doctoral titulada "Caracterización fenotípica, fisiológica y molecular de la respuesta a salinidad y sequía en tomate cultivado (*Solanum lycopersicum*) y silvestre (*S. pennellii*)" realizada por D^a. Irene Albaladejo Carrasco, bajo mi inmediata dirección y supervisión, y que presenta para la obtención del grado de Doctor por la Universidad de Murcia.

En Murcia, a 17 de abril de 2018

Fdo. María Isabel Egea Sánchez

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, quiero dar las gracias a **M^a Carmen Bolarín** por guiarme durante estos cuatro años y enseñarme tanto. Es la fuerza incansable de este grupo de investigación.

También a **Vicente Moreno** (IBMCP), **Rafael Lozano** (UAL), y las personas que forman parte de sus grupos de investigación, que con su trabajo han contribuido a mejorar esta tesis. Especialmente, quería agradecer a **Juan** y **Carmen** su inestimable ayuda durante mi estancia en la UAL.

A mi co-director, **Borja Flores**, por su gran apoyo en la realización de esta Tesis. Agradezco mucho la confianza y el aprecio que me ha demostrado siempre.

A mi co-directora y amiga, **Isabel Egea**. Mil gracias por guiarme desde el principio, por ayudarme a pensar de forma crítica y, sobre todo, por ese optimismo y alegría que se contagian. Gracias por aligerar los cientos de horas de trabajo, por compartir conmigo penas y alegrías, recesos, congresos, y tantas otras cosas. El equipo “Jefalica” ha dejado el listón muy alto.

También quiero dar las gracias de forma especial a mis compañeros de grupo, que han contribuido tanto a hacer posible esta tesis. A **Félix**, que me hizo sentirme una más desde el principio. Gracias por enseñarme a cultivar *pennellii* con amor, a amplificar altavoces en la cámara de cultivo y a mil cosas más. A **Vito**, porque nadie más tiene ese arte para “majaronear”. A **Belén**, por su ayuda inestimable tanto en el laboratorio como fuera de él, muchas gracias por todas las conversaciones enriquecedoras (¡y las comidas!). A **Juanfra**, que me bautizó en el grupo y que tanto me ha ayudado y hecho reír. A **Marga** y a **Carmen**, por su cariño y sus valiosos consejos.

Gracias a dos grandes personas con las que he compartido comidas en el CEBAS y también grandes momentos fuera del CEBAS: **Isa (Abris)** y **Sonia**. Cuando faltan, se nota demasiado.

Al resto de compañeros del CEBAS, con los que también he pasado muy buenos ratos, especialmente a **Silvia**, **Nieves** y **Fabiola**.

No puedo dejar de agradecer a **mi familia** su apoyo incondicional, en especial a mis padres, por la educación que me han regalado y por creer siempre en mí. Sin ellos no estaría donde estoy.

Y a **Aurora**, gracias por todo. Por ser tan especial, por su admiración, por creer en mí siempre, por ponerle música a mi vida. No podría ser más afortunada.

A **todos**, muchas gracias.

RESUMEN

La sequía y salinidad son dos de los principales factores limitantes para la producción agrícola, y se prevé su agravamiento debido a los efectos del cambio climático y al aumento de la población mundial. Por ello, un objetivo prioritario en biología vegetal es avanzar en el conocimiento de los mecanismos y genes implicados en la tolerancia a ambos estreses abióticos de especies de interés agronómico, como tomate (*Solanum lycopersicum* L.), para así favorecer el desarrollo de variedades mejor adaptadas a estas condiciones ambientales adversas. Dos estrategias interesantes para abordar este objetivo son el estudio de especies silvestres relacionadas con el tomate cultivado, ya que poseen un alto grado de tolerancia a estreses abióticos, y el análisis de mutantes afectados en genes clave implicados en los mecanismos de tolerancia. En esta tesis doctoral se ha combinado el análisis fenotípico, fisiológico y molecular para la caracterización de tomate cultivado, la especie silvestre *Solanum pennellii*, y dos mutantes de ambas especies. Dichos mutantes pertenecen a las colecciones obtenidas en un proyecto coordinado entre los grupos de investigación del CEBAS (Murcia), IBMCP (Valencia) y la Universidad de Almería, en el cual se enmarca esta tesis doctoral. En el primer capítulo de este trabajo, se ha llevado a cabo un estudio comparativo entre el tomate cultivado y *S. pennellii* en condiciones de sequía y salinidad. La tolerancia a sequía de la especie *S. pennellii* está relacionada con la inducción de genes implicados en el metabolismo del nitrógeno, la homeostasis redox y el metabolismo/señalización de jasmonato y etileno. También se ha demostrado que el control de la pérdida de agua a través de las hojas es un mecanismo clave de la tolerancia de *S. pennellii* tanto a sequía como a salinidad. Para minimizar la pérdida de agua, las hojas de la especie silvestre poseen distintas características anatómicas, tanto a nivel constitutivo (mayor grosor foliar y tamaño celular de *S. pennellii* respecto a *S. lycopersicum*), como modificaciones específicas en condiciones de estrés, que incluyen la reducción de la densidad estomática y el engrosamiento de la pared celular. Además, el mantenimiento de un elevado contenido de agua en las hojas de *S. pennellii* está relacionado con la regulación de genes que codifican acuaporinas. En cuanto a los mecanismos que determinan la tolerancia de *S. pennellii* al estrés salino, nuestro estudio ha revelado que la acción coordinada de los genes *SOS1* y *HKT1;2* determinan el elevado transporte de Na^+ hasta las hojas de la especie silvestre, donde es almacenado de forma eficiente en sus grandes vacuolas, favorecido por una mayor expresión de *NHX3* y *NHX4*. Finalmente, en el

Resumen

El primer capítulo de la tesis se ha avanzado en la caracterización del mutante *pennellii salt hypersensitive (psh)*. Nuestros resultados sugieren que la acumulación masiva de agua y Na^+ observada en la parte aérea del mutante se debe, por una parte, al co-transporte de ambos solutos mediado por acuaporinas, como PIP2;1 y, por otra, a la alteración de la expresión de *HKT1;2*, que también favorece la acumulación de Na^+ en la parte aérea del mutante. En el segundo capítulo de la tesis doctoral, se ha analizado en primer lugar el transcriptoma del mutante de tomate *res (restored cell structure by salinity)* con el objetivo de dilucidar las bases moleculares de las alteraciones fenotípicas observadas en el mutante y su normalización en estrés salino. El elevado número de genes alterados constitutivamente, especialmente en raíz, indica que la inhibición del desarrollo del mutante *res* cuando las plantas se cultivan sin estrés es una consecuencia del desequilibrio del balance desarrollo-estrés. Además, se han identificado genes que podrían ser determinantes de la tolerancia del tomate a la salinidad, incluidos genes relacionados con la eficiencia de la fotosíntesis, homeostasis de proteínas y factores de transcripción. Posteriormente, se ha determinado que el fenotipo del mutante *res* está provocado por una mutación en el gen *SIDEAD39*, que codifica para un miembro de la familia de proteínas DEAD-box RNA helicasas. Además, nuestros análisis han revelado que *SIDEAD39* está implicada en la maduración del rRNA 23S del ribosoma del cloroplasto, función que está alterada en el mutante *res* pero que se recupera parcialmente en salinidad. Finalmente, se ha discutido un posible mecanismo molecular para explicar la recuperación del procesamiento normal del rRNA 23S en el mutante durante el estrés salino.

ABSTRACT

Drought and salinity are two major limiting factors in agriculture, and they are predicted to become more widespread due to global climate change and the rising of the world population. Thus, a priority objective for plant biologists is to advance in the knowledge of the main mechanisms and genes controlling drought and salt tolerance in economically-relevant agricultural crops, among them tomato (*Solanum lycopersicum* L.), in order to enhance the development of new varieties that can grow and hold yields under these abiotic stresses. To achieve this goal, one interesting approach is to study wild species related to tomato, as these generally show high levels of tolerance to abiotic stresses. Another promising approach is the identification and analysis of mutants affected in key genes involved in tolerance mechanisms. In this PhD thesis, phenotypical, physiological and molecular analyses were combined in order to characterize cultivated tomato, the wild species *Solanum pennellii* and two mutants obtained in both species. The mutants studied in this research work belong to the collections generated within a coordinated project carried out by the research groups from CEBAS (Murcia), IBMCP (Valencia) and the University of Almería, in which this PhD thesis is framed. In the first chapter, a comparative study between cultivated tomato and *S. pennellii* was carried out under drought and salt stresses. The tolerance of *S. pennellii* to drought is related to the induction of genes involved in nitrogen metabolism, redox homeostasis and metabolism/signalling of jasmonate and ethylene. Moreover, we showed that the control of water loss through the leaves is a key determinant for drought and salinity tolerance in the wild species. In order to reduce water loss, the leaves of *S. pennellii* show several constitutive features, such as higher thickness and cell size compared to the leaves of cultivated tomato, as well as specific modifications under stress conditions, including the reduction of stomatal density and thickening of the cell wall. In addition, the maintenance of a high water content in *S. pennellii* leaves is related to the regulation of genes encoding aquaporins. Regarding the mechanisms controlling salinity tolerance, this study revealed that the coordinated role of *SOS1* and *HKT1;2* determine the high Na^+ transport to the leaves of *S. pennellii*, where it is efficiently accumulated inside its huge vacuoles, as reflected by the higher expression of the genes *NHX3* and *NHX4*. Finally, in the first chapter of this PhD work, we advanced in the characterization of the mutant *pennellii salt hypersensitive (psh)*. The results suggest that the massive accumulation of water and Na^+ observed in the

Abstract

shoot of the mutant is due, on the one hand, to the co-transport of both solutes mediated by aquaporins, such as PIP2;1, and on the other, to the alteration of *HKT1;2* expression, which also contributes to the accumulation of Na⁺ in the aerial tissues of *psh*. In the second chapter of this PhD work, we first carried out the transcriptomic profiling of the *res* (*restored cell structure by salinity*) tomato mutant, in order to elucidate the molecular basis of the phenotypic alterations observed under non-stressful conditions and their recovery under salinity. The significant number of genes constitutively altered in *res*, especially in roots, revealed that the growth inhibition observed under non-stressful conditions is a consequence of an imbalance in the growth-defence trade-off. Moreover, several genes which may be important for salinity tolerance in tomato, including those related to photosynthetic efficiency, protein homeostasis and transcription factors, were identified. Subsequently, we discovered that the *res* phenotype is caused by a mutation in the gene *SIDEAD39*, which encodes for a member of the DEAD-box RNA helicase protein family. Moreover, our analyses revealed that *SIDEAD39* is involved in the maturation of the rRNA 23S from the chloroplast ribosome, a function altered in the *res* mutant under control conditions but partially recovered under salt stress. Finally, a possible molecular mechanism to explain the recovery of 23S rRNA processing under salinity is discussed.

RESUMEN.....	I
ABSTRACT.....	III
ÍNDICE.....	V
ABREVIATURAS.....	XI
ÍNDICE DE FIGURAS.....	XV
ÍNDICE DE TABLAS.....	XIX
I. INTRODUCCIÓN.....	1
1. El tomate cultivado (<i>Solanum lycopersicum</i> L.)	1
1.1. Origen y domesticación del tomate.	1
1.2. Importancia económica y distribución geográfica del tomate.....	2
2. Problemática de los estreses abióticos: salinidad y sequía y sus efectos sobre las plantas.....	4
2.1. Estrés osmótico inducido por salinidad y sequía, y mecanismos de respuesta de las plantas frente a dicho estrés.....	7
2.2. Estrés iónico inducido por la salinidad y mecanismos de respuesta de las plantas frente a dicho estrés.....	10
2.3. Estrés oxidativo inducido por la salinidad y mecanismos de respuesta de las plantas frente a dicho estrés.....	12
3. Genes implicados en la homeostasis de Na⁺	12
3.1. Absorción de Na ⁺	13
3.2. Exclusión y transporte a larga distancia de Na ⁺	14
3.3. Compartimentación vacuolar de Na ⁺	18
4. Mejora genética de tomate.....	19
4.1. Especies silvestres relacionadas con tomate y su importancia como fuente de variabilidad genética.....	21
5. Análisis de mutantes como herramienta para la identificación de genes con un papel relevante en la tolerancia de tomate a sequía y salinidad.....	23

II. OBJETIVOS.....	25
III. MATERIALES Y MÉTODOS.....	29
1. Material vegetal.....	29
2. Condiciones de cultivo de plantas.....	29
2.1. Cultivo en sustrato.....	31
2.2. Cultivo hidropónico.....	31
2.3. Cultivo en condiciones de invernadero para la obtención de semillas.....	32
3. Análisis fisiológicos.....	34
3.1. Desarrollo de biomasa.....	34
3.2. Contenido de agua.....	34
3.3. Agua transpirada y pérdida de agua en folíolos escindidos.....	35
3.4. Parámetros de intercambio gaseoso: conductancia estomática (g_s), tasa de transpiración foliar (E), y tasa de fotosíntesis neta (A).....	35
3.5. Termografía infrarroja.....	36
3.6. Determinación del contenido de clorofila y eficiencia fotosintética (F_v/F_m).....	36
3.7. Determinación del índice de peroxidación de lípidos mediante la producción de malondialdehído (MDA).....	37
3.8. Contenido de iones inorgánicos.....	38
3.9. Tasa de translocación de agua e iones.....	39
3.10. Contenido de azúcares y ácidos orgánicos.....	39
3.11. Potencial osmótico.....	40
4. Análisis de microscopía.....	41
4.1. Determinación de la densidad y apertura estomática.....	41
4.2. Determinación de las características anatómicas del mesófilo foliar y la ultraestructura celular.....	42
5. Análisis de expresión génica mediante PCR.....	44
5.1. Extracción de RNA.....	44
5.2. Determinación del grado de integridad y pureza del RNA extraído.....	45
5.3. Síntesis de cDNA.....	45

5.4. PCR cuantitativa a tiempo real (RT-qPCR).....	46
6. Tratamiento estadístico.....	48
IV. CAPÍTULO I. RESPUESTA FENOTÍPICA, FISIOLÓGICA Y MOLECULAR DE LA ESPECIE SILVESTRE <i>SOLANUM PENNELLII</i> A LOS ESTRESSES HÍDRICO Y SALINO.....	51
1. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS.....	51
2. METODOLOGÍA.....	53
2.1. Diseño experimental de los ensayos de estrés hídrico.....	53
2.2. Diseño experimental de los ensayos de estrés salino.....	54
2.2.1. Estudio comparativo de tomate y <i>S. pennellii</i> en estrés salino.....	54
2.2.2. Caracterización del mutante <i>pennellii salt hypersensitive (psh)</i>	54
2.3. Análisis transcriptómico de tomate y <i>S. pennellii</i> en estrés hídrico.....	55
2.4. Análisis de expresión génica mediante RT-qPCR.....	56
3. RESULTADOS	58
3.1. Respuesta de la especie silvestre <i>S. pennellii</i> al estrés hídrico.....	58
3.1.1. Diferencias fisiológicas entre el tomate cultivado y <i>S. pennellii</i>	58
3.1.2. El análisis transcriptómico comparativo entre hojas de tomate cultivado y <i>S. pennellii</i> muestra importantes diferencias de expresión a nivel constitutivo.....	62
3.1.3. Genes inducidos por la sequía en <i>S. pennellii</i>	66
3.2. Respuesta de <i>S. pennellii</i> al estrés salino.....	71
3.2.1. Evolución del desarrollo y contenido de agua de <i>S. lycopersicum</i> y <i>S. pennellii</i> en estrés salino.....	71
3.2.2. Pérdida de agua transpiracional y expresión de genes de acuaporinas en estrés salino.....	74
3.2.3. Evolución de la densidad y apertura estomática y cambios anatómicos en células del mesófilo en tomate cultivado y <i>S. pennellii</i>	76
3.2.4. Acumulación de solutos en raíces y hojas de tomate y <i>S. pennellii</i>	80
3.2.5. Análisis de expresión de genes implicados en la homeostasis de Na ⁺	83
3.3. Caracterización fenotípica, fisiológica y molecular del mutante <i>pennellii salt hypersensitive (psh)</i>	85

3.3.1. Diferencias fenotípicas y anatómicas inducidas por la salinidad en el mutante	85
3.3.2. Evolución del contenido de agua e iones en raíz, tallo y hojas de <i>S. pennellii</i> y <i>psh</i> en estrés salino.....	92
3.3.3. Análisis de expresión de genes implicados en el transporte de agua y de los iones Na ⁺ y K ⁺	94
4. DISCUSIÓN.....	98
4.1. La tolerancia de la especie silvestre <i>S. pennellii</i> a la deshidratación está asociada tanto a diferencias de expresión constitutivas como a genes específicamente inducidos por el estrés	98
4.2. El control de la pérdida de agua es un mecanismo fundamental en la tolerancia de <i>S. pennellii</i> a sequía y salinidad. Importancia de las adaptaciones anatómicas de la hoja frente al estrés.....	101
4.3. La diferente acumulación de Na ⁺ entre <i>S. lycopersicum</i> y <i>S. pennellii</i> está relacionada con un patrón diferencial de expresión de <i>SOS1</i> y <i>HKT1;2</i>	105
4.4. El fenotipo del mutante <i>psh</i> está relacionado con un co-transporte elevado de agua y Na ⁺ a las hojas.....	109
4.5. El transporte masivo de Na ⁺ a las hojas satura la capacidad vacuolar en el mutante <i>psh</i> y causa citotoxicidad.....	113
V. CAPÍTULO II. ANÁLISIS TRANSCRIPTÓMICO DEL MUTANTE DE TOMATE RES (<u>RESTORED CELL STRUCTURE BY SALINITY</u>) E IDENTIFICACIÓN DEL GEN RESPONSABLE DEL FENOTIPO MUTANTE.....	117
1. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS.....	117
2. METODOLOGÍA.....	118
2.1. Análisis transcriptómico de tomate vs mutante <i>res</i> en control y estrés salino.....	118
2.1.1. Validación del microarray mediante RT-qPCR.....	120
2.2. Identificación y análisis funcional del gen <i>RES</i>	121
2.2.1. Mapeo del locus <i>RES</i> y alineamiento de secuencias.....	121
2.2.2. Generación de líneas transgénicas de sobreexpresión y silenciamiento génico.....	122

2.2.3. Ensayos de caracterización de las líneas de sobreexpresión, complementación y silenciamiento de <i>RES</i>	123
2.2.4. Análisis Northern Blot.....	124
2.2.5. Análisis de expresión génica de genes que codifican DEAD-box RNA helicasas mediante RT-qPCR.....	124
3. RESULTADOS	126
3.1. Análisis transcriptómico comparativo en raíz y hoja de plantas WT y del mutante <i>res</i> desarrolladas en control y en medio salino.....	126
3.1.1. Genes relacionados con el metabolismo de hormonas y rutas de señalización.....	131
3.1.2. Genes que codifican factores de transcripción y proteínas de estrés.....	134
3.1.3. Genes implicados en el metabolismo de proteínas.....	137
3.1.4. Genes implicados en el desarrollo vegetal, la fotosíntesis y el metabolismo energético.....	137
3.1.5. Análisis por RT-qPCR de genes seleccionados y validación del microarray.....	140
3.2. Identificación y análisis funcional del gen alterado en el mutante <i>res</i>	144
3.2.1. Identificación del gen <i>RES</i>	144
3.2.2. Análisis fenotípico de las líneas de sobreexpresión y silenciamiento de <i>SIDEAD39</i>	147
3.2.3. Análisis del procesamiento del RNA ribosomal 23S en plantas WT y <i>res</i> mediante Northern Blot.....	155
3.2.4. Análisis de expresión de <i>SIDEAD39</i> y otros genes de DEAD-box RNA-helicasas cloroplastidiales en plantas WT y <i>res</i>	156
4. DISCUSIÓN	160
4.1. Análisis transcriptómico del mutante <i>res</i>	160
4.1.1. La normalización del fenotipo <i>res</i> en salinidad está relacionada con una considerable reducción de la alteración constitutiva de genes en raíz.....	160
4.1.2. La normalización del fenotipo <i>res</i> en salinidad está relacionada con la inducción en hoja de genes que promueven la tolerancia a estrés y la fotosíntesis.....	161

Índice

4.1.3. Los factores de transcripción <i>WRKY39</i> y <i>MYB14</i> y el inhibidor de proteasas <i>MPI</i> pueden ser claves en la tolerancia del mutante <i>res</i>	163
4.2. Identificación y análisis funcional del gen <i>RES</i>	164
4.2.1. El gen <i>RES</i> codifica para SIDEAD39, una proteína DEAD-box RNA helicasa.....	164
4.2.2. SIDEAD39 está implicada en el procesamiento del RNA ribosomal 23S del cloroplasto.....	165
4.2.3. SIDEAD39 juega un papel clave en la regulación del balance desarrollo-tolerancia a estrés.....	166
VI. CONCLUSIONES.....	173
VII. BIBLIOGRAFÍA.....	179
VIII. ANEXOS.....	207
Anexo I. Lista de transcritos con diferencias de expresión significativas entre <i>S. pennellii</i> y <i>S. lycopersicum</i> en control y estrés hídrico, así como los diferencialmente expresados entre condiciones en <i>S. pennellii</i>	205

ABREVIATURAS

A	Fotosíntesis neta
ABA	Ácido abscísico
Abs	Absorbancia
AOX	Alternativa oxidasa
APX	Ascorbato peroxidasa
ATP	Adenosín trifosfato
BCAA	Aminoácidos de cadena ramificada
C	Control
CA	Anhidrasa carbónica
Ca²⁺	Ion calcio
cDNA	DNA complementario, sintetizado a partir de RNA mensajero
CE	Conductividad eléctrica
Cl⁻	Ion cloruro
cm	Centímetros
CO₂	Dióxido de carbono
cv	Cultivar
d	Día
DBRH	DEAD-box RNA helicasa
DNA	Acido desoxirribonucleico
dNTP	Desoxinucleótidos trifosfato
dS	Decisiemens
DTS	Días de tratamiento salino
E	Transpiración foliar
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EH	Estrés hídrico
ERF	Factor de respuesta de etileno (<i>Ethylene Response Factor</i>)
ES	Estrés salino
ET	Etileno
FAO	Organización para la Alimentación y la Agricultura
FAOSTAT	Organización para la agricultura y la alimentación de las naciones unidas
FDR	<i>False Discovery Rate</i>
g	gramos
GDE	Gen diferencialmente expresado
gs	Conductancia estomática

Abreviaturas

GS/GOGAT	Glutamina sintasa/glutamato sintasa
h	Hora
H₂O	Agua
H₂O₂	Peróxido de hidrógeno
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución
ICP	Espectrofotómetro de iones acoplado a plasma
JA	Jasmonato
K⁺	Potasio
kb	Miles de pares de bases
KCl	Cloruro potásico
kg	Kilogramos
kV	Kilovatio
L	Litro
LSD	Diferencia mínima significativa
LTP	Proteína de transferencia de lípidos
m	Metros
M	Molar
m²	Metros cuadrados
MAPAMA	Ministerio de Agricultura, Pesca, Alimentación y Medio Ambiente
mb	Milibar
Mb	Millones de pares de bases
MDA	Malondihaldeído
mg	Miligramos
Mg²⁺	Magnesio
min	Minutos
mL	Mililitros
mM	Milimolar
M-MLV-RT	Retrotranscripción del virus de la leucemia murina Moloney
MMt	Millones de toneladas
mOsmol	Miliosmoles
MPa	Megapascales
MPI	Inhibidor de metalocarboxipeptidasa
mRNA	Ácido ribonucleico mensajero
mV	Milivoltios
N	Nitrógeno

Na⁺	Ion sodio
NaCl	Cloruro sódico
NH₄⁺	Amonio
nm	Nanómetros
NO₃⁻	Nitrato
°C	Grados centígrados
OES	Espectrometría de emisión óptica
PAR	Radiación fotosintéticamente activa
pb	Pares de bases
PCA	Análisis de componentes principales
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PF	Peso fresco
ppm	Partes por millón
PS	Peso seco
<i>psh</i>	<i>pennellii salt hypersensitive</i>
qPCR	Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa a tiempo real
RCA	RuBisco activasa
<i>res</i>	<i>restored cell structure by salinity</i>
RLK	Receptor quinasa
RMA	<i>Robust Multichip Array</i>
RNA	Ácido ribonucleico
RNAi	RNA de interferencia
ROS	Especies reactivas de oxígeno
rpm	Revoluciones por minuto
rRNA	RNA ribosomal
RT	Retrotranscripción
s	Segundos
SEM	Microscopía electrónica de barrido
SGN	Solanaceae Genome Network
<i>Sl</i>	<i>Solanum lycopersicum</i>
SNP	Polimorfismo de nucleótido simple
SOD	Superóxido dismutasa
<i>Sp</i>	<i>Solanum pennellii</i>
T^a	Temperatura
TBA	Ácido tio-barbitúrico

Abreviaturas

TBARS	Sustancias reactivas del ácido tio-barbitúrico
TCA	Ácido tricloroacético
T-DNA	Ácido desoxirribonucleico de transferencia
TEM	Microscopía electrónica de transmisión
TG	Generación determinada de plantas transgénicas
TI	Termografía infrarroja
uds	Unidades
UV	Ultravioleta
V	Voltios
WT	Planta no transformada (<i>wild-type</i>)
μL	Microlitro
μm	Micrómetro
μmoles	Micromoles
Ψπ	Potencial osmótico

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Producción mundial de tomate.	3
Figura 2. Representación de los efectos de las fases osmótica e iónica inducidas por la salinidad en el desarrollo de la planta.....	6
Figura 3. Representación de los efectos del estrés hídrico y salino, y respuestas adaptativas de las plantas frente a los mismos.....	13
Figura 4. Principales proteínas de transporte implicadas en la absorción, transporte y compartimentación de Na ⁺ en la planta.....	15
Figura 5. Representación esquemática de la ruta SOS durante el estrés salino.....	16
Figura 6. Aspecto general del sistema de cultivo hidropónico.....	31
Figura 7. Cultivo de plantas en el invernadero.....	32
Figura 8. Diferencias en el grado de deshidratación del tomate cultivado (<i>Sl</i>) y la especie silvestre <i>S. pennellii</i> (<i>Sp</i>).....	59
Figura 9. Diferencias fisiológicas y anatómicas inducidas por el estrés hídrico en las hojas de <i>Sl</i> y <i>Sp</i>	61
Figura 10. Resumen del análisis transcriptómico comparativo entre las hojas de <i>Sl</i> y <i>Sp</i>	63
Figura 11. Validación del microarray mediante análisis por RT-qPCR de 11 genes seleccionados en control (C) y estrés hídrico (EH).....	64
Figura 12. Diferencias de expresión constitutivas entre <i>Sl</i> y <i>Sp</i> obtenidas en el análisis microarray.....	65
Figura 13. Diferencias de expresión entre <i>Sl</i> y <i>Sp</i> de genes relacionados con el metabolismo del carbono y nitrógeno.....	67
Figura 14. Genes diferencialmente expresados en <i>Sp</i> respecto a <i>Sl</i> en estrés hídrico (EH), y genes inducidos por el estrés hídrico en <i>Sp</i> respecto a control.....	70
Figura 15. Evolución del desarrollo de las plantas de <i>Sp</i> y <i>Sl</i> sometidas a estrés salino (100 mM NaCl durante 14 días).....	72
Figura 16. Evolución del contenido de agua en raíces y hojas de plantas de <i>Sp</i> y <i>Sl</i> sometidas a estrés salino (100 mM NaCl durante 14 días).....	73

Figura 17. Análisis de expresión de genes que codifican acuaporinas y evolución de la temperatura foliar de <i>Sl</i> y <i>Sp</i>	75
Figura 18. Densidad y apertura estomática en hojas de plantas de <i>Sp</i> y <i>Sl</i> en ausencia de estrés (control) y tras 7 días de estrés salino (100 mM NaCl).....	76
Figura 19. Grosor de la cutícula de la hoja de <i>Sl</i> y <i>Sp</i>	78
Figura 20. Diferencias anatómicas existentes en el mesófilo foliar de <i>Sl</i> y <i>Sp</i>	79
Figura 21. Transporte de iones en <i>Sp</i> y <i>Sl</i> a lo largo del estrés salino (100 mM NaCl durante 14 días).....	81
Figura 22. Análisis por RT-qPCR de los principales genes implicados en la homeostasis de Na ⁺ en <i>Sl</i> y <i>Sp</i>	84
Figura 23. Evolución fenotípica de plantas WT (<i>S. pennellii</i>) y del mutante <i>psh</i> sometidas a estrés salino.....	86
Figura 24. Evolución de biomasa, clorofila y eficiencia fotoquímica de WT y <i>psh</i>	87
Figura 25. Recuperación del fenotipo WT observada en plantas del mutante <i>psh</i> tras interrumpir el estrés salino (ES).....	88
Figura 26. Características anatómicas de las células del mesófilo foliar de plantas WT y mutante <i>psh</i>	90
Figura 27. Densidad y apertura estomática en hojas de plantas WT y del mutante <i>psh</i>	91
Figura 28. Evolución del contenido de agua, Na ⁺ y Cl ⁻ en raíz, tallo y hoja de plantas WT y <i>psh</i> a lo largo del tratamiento salino (14 días 100 mM NaCl), así como velocidad de transporte de los mismos a la parte aérea (translocación neta).....	93
Figura 29. Evolución del contenido de K ⁺ en raíz, tallo y hoja de plantas WT y <i>psh</i> a lo largo del tratamiento salino (14 días 100 mM NaCl), así como la relación Na ⁺ /K ⁺ obtenida en cada tejido.....	94
Figura 30. Análisis por RT-qPCR de genes implicados en el transporte de agua en raíz, tallo y hoja de plantas WT y <i>psh</i>	95
Figura 31. Análisis por RT-qPCR de los principales genes implicados en la homeostasis de Na ⁺ en raíz, tallo y hoja de plantas WT y <i>psh</i>	96

Figura 32. Análisis por RT-qPCR del principal gen implicado en la transporte de K^+ a larga distancia, <i>SKOR</i> , en ausencia de estrés (día 0) y tras 1 y 3 días de tratamiento salino (DTS, 100 mM NaCl).....	97
Figura 33. Modelo propuesto en función de los resultados de este trabajo que recoge los procesos fisiológicos y los genes implicados en la tolerancia de <i>Sp</i> a sequía y salinidad.....	108
Figura 34. Modelo comparativo de la regulación de la homeostasis de Na^+ en las hojas de <i>Sl</i> , <i>Sp</i> y el mutante <i>psh</i> acorde a los resultados obtenidos en este trabajo.....	113
Figura 35. Normalización del fenotipo del mutante <i>res</i>	127
Figura 36. Resumen del análisis transcriptómico comparativo entre WT y <i>res</i> en cada condición.....	128
Figura 37. Resumen del análisis transcriptómico comparativo entre estrés salino y control para cada especie.....	129
Figura 38. Diagramas de estrés representados por el programa Mapman, los cuales ilustran los genes diferencialmente expresados entre WT y <i>res</i> en hojas y raíces control y tratadas con 100 mM NaCl durante 5 días (estrés salino).....	130
Figura 39. Análisis mediante RT-qPCR de genes diferencialmente expresados (GDEs) relevantes entre <i>res</i> y WT en ausencia de estrés (control) y tras 5 días de exposición a 200 mM NaCl (estrés salino).....	141
Figura 40. Validación del análisis microarray.....	143
Figura 41. Identificación del gen <i>RES</i>	145
Figura 42. Alineamiento de la secuencia de aminoácidos de RH39 de Arabidopsis y DEAD39 de tomate mediante Clustal.....	146
Figura 43. Complementación del fenotipo <i>res</i>	148
Figura 44. Caracterización fenotípica de las líneas de complementación C-2 y C-14 en ausencia de estrés (control) y estrés salino (ES, 200 mM NaCl durante 10 días).....	149
Figura 45. Caracterización fenotípica de las líneas de sobreexpresión O-4 y O-9 en ausencia de estrés (control) y estrés salino (ES, 200 mM NaCl durante 10 días).....	150
Figura 46. Caracterización fenotípica de las líneas transgénicas de silenciamiento de <i>SIDEAD39</i>	152

Índice de figuras

Figura 47. Caracterización fenotípica en estrés salino (200 mM NaCl durante 10 días) de plantas WT, <i>res</i> y RNAi-9.....	153
Figura 48. Fenotipo de plantas adultas de la línea de silenciamiento RNAi-9.....	154
Figura 49. Análisis del procesamiento del RNA ribosomal 23S del cloroplasto (rRNA 23S) en plantas WT y <i>res</i> mediante Northern Blot.....	156
Figura 50. Análisis de expresión por RT-qPCR de los genes que codifican DEAD-box RNA helicasas cloroplastidiales en la 3ª hoja desarrollada de plantas WT, <i>res</i> y RNAi-9, en ausencia de estrés (control), y tras 1 día de exposición a 200 mM NaCl (1 DTS).....	159

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Superficie y producción de tomate en España correspondientes al año 2016....	4
Tabla 2. Especies de tomate y su distribución geográfica.....	22
Tabla 3. Características agronómicas de interés de las especies silvestres de tomate...	23
Tabla 4. Parámetros ambientales programados en la cámara de cultivo de condiciones controladas.....	30
Tabla 5. Composición de la disolución nutritiva Hoagland diluida al 50%.....	30
Tabla 6. Composición de la disolución nutritiva empleada para el riego de las plantas en el invernadero.....	33
Tabla 7. Condiciones de trabajo del HPLC.....	40
Tabla 8. Mezcla de reacción final para una reacción simple de síntesis de cDNA.....	46
Tabla 9. Condiciones programadas en el termociclador para la síntesis de cDNA.....	46
Tabla 10. Mezcla de reacción final para la RT-qPCR.....	47
Tabla 11. Programa utilizado en el termociclador para la reacción de PCR cuantitativa.....	48
Tabla 12. Parejas de cebadores utilizados en los ensayos de RT-qPCR para los análisis de expresión génica en tomate y <i>S. pennellii</i>	57
Tabla 13. Diferencias entre <i>S. lycopersicum</i> (<i>Sl</i>) y <i>S. pennellii</i> (<i>Sp</i>) en las concentraciones de los principales azúcares y ácidos orgánicos en hoja, valores de potencial osmótico absoluto y relativo ($\Psi\pi$), y contribución relativa de solutos al potencial osmótico.....	83
Tabla 14. Parejas de cebadores utilizados en los ensayos de RT-qPCR para la validación de microarray del mutante <i>res</i>	121
Tabla 15. Secuencia de los cebadores utilizados para generar las construcciones de sobreexpresión y silenciamiento de SIDEAD39.....	123
Tabla 16. Secuencia de los cebadores utilizados para generar las sondas radiactivas para hibridación de los distintos fragmentos de la secuencia del rRNA 23S.....	125

Tabla 17. Parejas de cebadores utilizados en los ensayos de RT-qPCR para analizar la expresión de los distintos genes que codifican DEAD-box RNA helicasas del cloroplasto.....	125
Tabla 18. Genes implicados en el metabolismo de hormonas. Conjunto representativo de genes que presentan diferencias de expresión significativas en raíces y hojas de plantas <i>res</i> y WT en ausencia de estrés (control) y tras 5 días de tratamiento con 200 mM NaCl (estrés salino, ES).....	132
Tabla 19. Conjunto representativo de genes implicados en rutas de señalización que presentan diferencias de expresión significativas en raíces y/o hojas de plantas <i>res</i> y WT en ausencia de estrés (control) y tras 5 días de tratamiento con 200 mM NaCl (estrés salino, ES).....	133
Tabla 20. Conjunto representativo de genes que codifican factores de transcripción con diferencias de expresión significativas en raíces y hojas de <i>res</i> y WT en ausencia de estrés (control) y tras 5 días de tratamiento con 200 mM NaCl (ES).....	135
Tabla 21. Conjunto representativo de genes de proteínas relacionadas con estrés que presentan diferencias de expresión significativas en raíces y hojas de <i>res</i> y WT en ausencia de estrés (control) y tras 5 días de tratamiento con 200 mM NaCl (ES).....	136
Tabla 22. Conjunto representativo de genes implicados en el metabolismo de proteínas que presentan diferencias de expresión significativas en raíces y/o hojas de plantas <i>res</i> y WT en ausencia de estrés (control) y tras 5 días de tratamiento con 200 mM NaCl (estrés salino, ES).....	138
Tabla 23. Conjunto representativo de genes implicados en procesos de desarrollo, modificación de la pared celular y control del ciclo celular, con diferencias de expresión significativas en raíces y hojas de <i>res</i> y WT en ausencia de estrés (control) y tras 5 días de tratamiento con 200 mM NaCl (ES).....	139
Tabla 24. Conjunto representativo de genes implicados en la fotosíntesis y procesos metabólicos relacionados que presentan diferencias de expresión significativas en hojas de plantas <i>res</i> y WT en ausencia de estrés (control) y tras 5 días de tratamiento con 200 mM NaCl (estrés salino, ES).....	140

Tabla 25. Análisis mediante RT-qPCR del patrón de expresión del gen *SIDEAD39* en distintos tejidos vegetativos y reproductivos de plantas de WT y *res* cultivadas en ausencia de estrés salino.....157

Tabla 26. Análisis de expresión por RT-qPCR de los genes que codifican DEAD-box RNA helicasas probablemente localizadas en el cloroplasto.....158

INTRODUCCIÓN

I. INTRODUCCIÓN

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

1.1. Origen y domesticación del tomate

El origen de los cultivos puede ser difícil de determinar, debido en parte a la acción humana de transporte y la extensión de su utilización en el mundo a partir de la globalización iniciada en el siglo XVI, cuando los europeos colonizaron por primera vez el Nuevo Mundo (Mann, 2011). Generalmente, se considera que el género *Lycopersicum* se originó 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 regiones orientales de los Andes, comprendiendo Colombia, Ecuador, Perú, Bolivia y Chile (Rick, 1973; Taylor, 1986; Esquinas-Alcázar y Nuez, 1995). La asignación de dicho origen se ha basado principalmente en la presencia de una gran diversidad de especies silvestres endémicas de zonas no antropizadas en estas regiones de Sudamérica.

Sin embargo, el origen exacto del tomate, y cómo y cuándo fue llevado por primera vez desde las Américas hasta Europa han sido objeto de debate desde finales del siglo XIX (de Candolle, 1886; Jenkins, 1948). De Candolle (1886) sugirió que el tomate se habría originado en Perú por razones históricas y botánicas, y lo apoyaron posteriormente otras investigaciones de Müller (1940) y Luckwill (1943). Más tarde, Jenkins (1948) sugirió que el origen del tomate se ubicaba en México y después se habría introducido en Europa, basándose sobre todo en evidencias lingüísticas (el nombre para *S. lycopersicum* en lengua náhuatl es 'tomatl', de donde deriva la palabra en castellano) y a la falta de evidencias arqueológicas concluyentes sobre la domesticación del tomate en Sudamérica. Más recientemente, algunos estudios han encontrado evidencias de que los tomates procedentes de Europa y América del Norte comparten isoenzimas similares y marcadores moleculares con los procedentes de México y Centroamérica, lo que sugiere que el tomate habría sido introducido a Europa y América del Norte desde estas regiones (Peralta y Spooner, 2006; Bauchet y Causse, 2012). No obstante, hasta la fecha ninguna de las hipótesis sobre el origen de la domesticación del tomate (Perú o México)

es más concluyente que la otra, e incluso podría ser que se produjera de forma independiente en ambas regiones.

1.2. Importancia económica y distribución geográfica del tomate

El tomate pertenece a la familia *Solanaceae*, que engloba a unas 3.000 especies entre las que se encuentran algunas de gran importancia económica como la patata, el pimiento, la berenjena y el tabaco.

El cultivo del tomate es uno de los más importantes y de mayor valor económico en la actualidad (FAOSTAT, 2016). Su demanda ha ido creciendo año tras año y con ella su cultivo, producción y comercio. En los últimos años, el incremento anual de la producción de tomate se ha debido sobre todo al aumento en el rendimiento del cultivo, y en menor medida al aumento de la superficie cultivada (Bergougnoux, 2014). Con una producción anual en aumento durante los últimos 20 años (Figura 1A), en el año 2016 se produjeron en el mundo 177 MMt (millones de toneladas) de tomate fresco (FAOSTAT, 2016). A día de hoy, Asia domina el mercado de tomate con más del 50% de la producción mundial, seguido por América, Europa, África y por último Oceanía con apenas un 0,4% (Figura 1B). China es el mayor productor a nivel mundial, con 56,3 MMt, seguido de India y EEUU con una producción de 18,4 y 13 MMt, respectivamente. España ocupa el octavo puesto mundial, con una producción en 2016 de 4,7 MMt (Figura 1C).

A nivel nacional, la Región de Murcia, con 288.747 toneladas producidas en 2016, es la tercera comunidad autónoma productora de tomate en España, por detrás de Andalucía y Extremadura (Tabla 1). Las principales variedades de tomate que se comercializan actualmente en la Región de Murcia son las siguientes: tipos Beef, Marmande, Vemone, Moneymaker, Cocktail, Cereza (Cherry), Larga Vida, Liso y Ramillete. Su producción se destina al mercado en fresco y se exporta gran parte de ella. El destino mayoritario de las exportaciones son los Países Bajos, donde se redistribuye a otros países como complemento de sus exportaciones en los meses improductivos (MAPAMA, 2016).

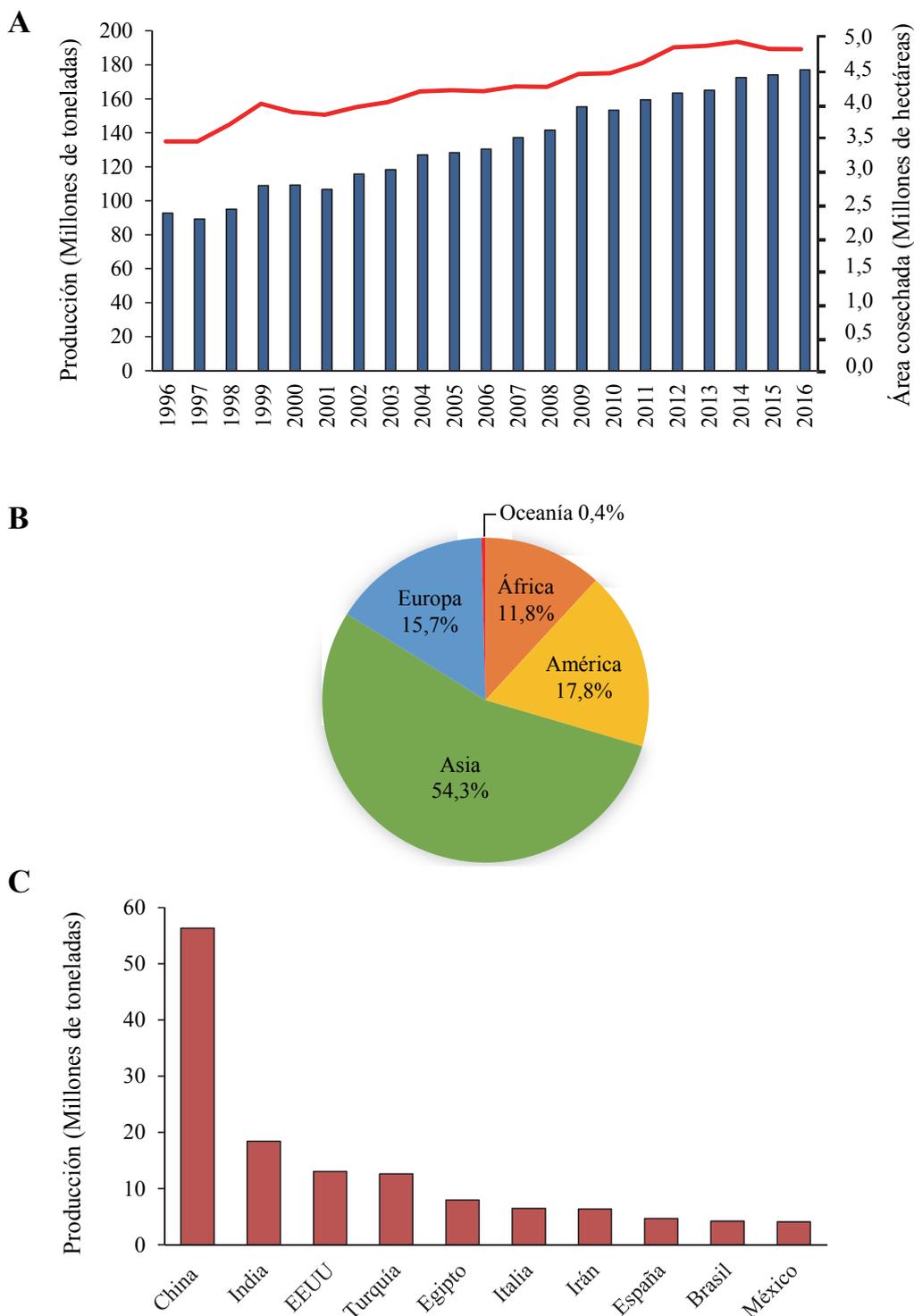


Figura 1. Producción mundial de tomate. **(A)** Producción (barras) y área cosechada (línea) de tomate fresco en todo el mundo entre 1996 y 2016. **(B)** Proporción de producción (%) de tomate en cada continente. **(C)** Producción de tomate en los 10 principales países productores en el mundo. Fuente: FAOSTAT (<http://www.fao.org/faostat/es/#data/QC>). Consultado el 28 de marzo de 2018.

Tabla 1. Superficie y producción de tomate en España correspondientes al año 2016.

Comunidades Autónomas	Superficie (hectáreas)			Total	Producción (toneladas)
	Secano	Regadío			
		Aire libre	Protegido		
Andalucía	104	10.984	14.859	25.947	2.485.839
Extremadura	–	24.332	–	24.332	1.772.026
Murcia	–	–	2.408	2.408	288.474
Navarra	–	2.186	50	2.236	183.330
Canarias	77	1.197	33	1.307	92.458
Galicia	–	222	879	1.101	89.356
Castilla-La Mancha	4	96	790	890	82.598
C. Valenciana	38	733	484	1.255	78.835
Aragón	38	720	6	764	55.337
Cataluña	59	1.060	141	1.260	52.454
Otras	146	825	244	1.215	52.835
ESPAÑA	466	42.355	19.894	62.715	5.233.542

Fuente: Anuario de Estadística Agraria. Consultado el 28 de marzo de 2018.

(<http://www.mapama.gob.es/es/estadistica/temas/publicaciones/anuario-de-estadistica/>).

2. Problemática de los estreses abióticos: salinidad y sequía y sus efectos sobre las plantas

La sequía y la salinidad son dos de los factores ambientales que más inciden sobre la productividad agrícola y limitan el uso potencial del nuevas áreas de cultivo (Flowers, 2004; Tester y Langridge, 2010; Munns, 2011; Golldack *et al.*, 2014; Hanin *et al.*, 2016). Se estima que la sequía es responsable de un 45% de las pérdidas en producción agrícola a nivel global (Foolad, 2007). Además, 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, incluyendo Almería, Murcia, Alicante y el Valle del Ebro, así como toda la franja atlántica de la costa marroquí (FAOSTAT, 2016).

Se prevé un aumento de la población en 30 años de unos 2.300 millones de personas, alcanzando los 9.700 millones en 2050, lo que requeriría producir un 70% más de alimentos (FAO, 2009; Naciones Unidas, 2017). Ello forzaría no solo a sobreexplotar las áreas ya cultivadas, sino a la expansión hacia nuevas zonas donde llevar a cabo la actividad agrícola, concretamente hacia zonas áridas y semiáridas, que suponen aproximadamente el 40% de la superficie mundial (Hanin *et al.*, 2016). Las regiones

áridas poseen suelos secos debido a la escasez de lluvias, temperaturas extremas y una alta velocidad de evaporación, por lo que la producción agrícola depende fuertemente de la irrigación. En estas condiciones, el efecto del uso continuado de aguas que contienen sales disueltas, así como el uso de elevadas cantidades de fertilizantes, además de otros factores como la 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 provoca la salinización de las áreas de cultivo. Para complicar aún más el escenario, los efectos del cambio climático también favorecen la extensión de la salinidad y la sequía (Ainsworth y Ort, 2010). Todo ello compromete la productividad de muchas especies vegetales importantes, entre ellas el tomate, que además es un importante cultivo en zonas áridas y semiáridas (Schwarz *et al.*, 2014; FAOSTAT, 2016).

Ante este escenario, el desarrollo de cultivos vegetales mejor adaptados y con mejores rendimientos en condiciones ambientales adversas como salinidad y sequía será vital para satisfacer las necesidades alimentarias de las futuras generaciones. 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 (o glicófitas), que son generalmente sensibles a dichos estreses, como en especies adaptadas a la sequía (xerófitas) y a medios salinos (halófitas) Estas últimas, las halófitas, son capaces de resistir concentraciones salinas de hasta 500 mM (Tester y Davenport, 2003; Bartels y Sunkar, 2005; Hasegawa, 2013; Gupta y Huang, 2014). La investigación en mejora de la tolerancia se dirige a la mejor comprensión de los efectos causados por estos estreses, tanto a nivel celular como de organismo completo, así como de las respuestas adaptativas de las plantas frente a los mismos. Para ello es necesario identificar tanto los componentes que determinan la tolerancia a estos estreses como los elementos reguladores de éstos (Joshi *et al.*, 2016; Zhu, 2016).

La salinidad se caracteriza por la presencia en el suelo o el riego de una alta concentración de sales solubles, cuando la conductividad eléctrica (CE) es igual o superior a $4,0 \text{ dS} \cdot \text{m}^{-1}$, equivalente aproximadamente a 40 mM NaCl (Munns y Tester, 2008). Los efectos nocivos de la salinidad sobre el crecimiento de las plantas se deben a la combinación de varios estreses (Greenway y Munns, 1980; Hasegawa *et al.*, 2000;

Introducción

Zhu, 2001), y en general, se distinguen dos fases: la osmótica y la iónica (Figura 2). La primera fase (osmótica) es muy temprana y se caracteriza por una reducción de la absorción de agua debida al efecto osmótico causado por la presencia de iones salinos en el medio. Esta fase es en gran medida equivalente a un estrés por sequía, y da lugar a una disminución marcada de la tasa de crecimiento de la planta. El crecimiento de la parte aérea es más sensible que el de las raíces a este efecto (Munns, 2002; Mahajan y Tuteja, 2005; Taiz y Zeiger, 2007; Munns y Tester, 2008; Pineda *et al.*, 2012). En segundo lugar, la salinidad provoca una toxicidad iónica específica asociada a la absorción excesiva de iones Na^+ y Cl^- . Si la velocidad a la que mueren las hojas adultas (hojas fuentes), que son aquellas en las que la planta procura concentrar en el exceso de Na^+ para evitar que llegue a órganos mucho más susceptibles como las hojas en desarrollo, es mayor que la velocidad a la que se producen nuevas hojas (hojas sumidero) la capacidad fotosintética de la planta ya no será capaz de suministrar hidratos de carbono suficientes a las hojas en desarrollo, lo que romperá el balance energético fuente-sumidero y por tanto reducirá la tasa de crecimiento vegetal (Munns, 2002; Munns y Tester, 2008; Pineda *et al.*, 2012). Además de los efectos osmótico e iónico, el estrés salino conduce a un desequilibrio nutricional o a una alteración en la distribución de iones esenciales como el K^+ , Ca^{2+} , nitrato o fosfato. Por último, la salinidad y la sequía conllevan procesos secundarios de estrés oxidativo debidos a la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) (Shanker *et al.*, 2004).

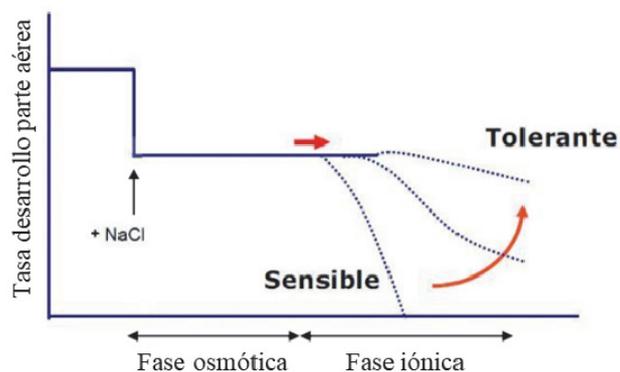


Figura 2. Representación de los efectos de las fases osmótica e iónica inducidas por la salinidad en el desarrollo de la planta, distinguiendo la tendencia que seguiría la planta en función de su grado de tolerancia o sensibilidad al estrés (líneas discontinuas). Adaptado de Munns y Tester (2008).

2.1. Estrés osmótico inducido por salinidad y sequía, y mecanismos de respuesta de las plantas frente a dicho estrés

Durante el estrés osmótico, la planta pierde su capacidad de absorción de agua por la raíz debido a la disminución del potencial hídrico del suelo, bien por la escasez de agua (en el caso de la sequía), o por una elevada concentración de sal (en el caso de la salinidad). Debido a las similitudes de los efectos de la sequía y la salinidad en este aspecto, algunos mecanismos de respuesta son comunes en ambos estreses (Uddin *et al.*, 2016). De hecho, una planta mejor adaptada a la sequía es probable que también se adapte mejor a condiciones de estrés salino, o al contrario, una planta más sensible a la sequía también es posible que lo sea a la salinidad. Ambos estreses provocan a nivel morfológico, fisiológico y molecular una amplia variedad de respuestas, entre ellas una reducción del turgor y el volumen de las células, alteración de actividades enzimáticas, producción de radicales libres, alteración de la fotosíntesis y deficiencias iónicas (Figura 3).

Los estreses causan un aumento de la concentración de Ca^{2+} libre en el citosol, lo que activa una cascada de señalización mediada por proteínas quinasa que culmina en la activación de proteínas diana involucradas en la protección de la célula o factores de transcripción (TFs) que regulan genes de respuesta frente al estrés (Xiong *et al.*, 2002; Bergey, 2014; Zhu, 2016). En el caso de la sequía y la salinidad, esta señalización coordina la reprogramación metabólica necesaria para alcanzar la homeostasis hídrica e iónica y la estabilidad celular.

La primera respuesta de la planta frente al estrés osmótico es la inducción de mecanismos para evitar la pérdida de agua por transpiración. Los estomas son unas estructuras que se encuentran en la epidermis foliar y están formados por dos células guarda que rodean a un poro estomático, cuya apertura y cierre es el resultado de cambios en volumen y turgencia de las células guarda. La regulación estomática es importante para el crecimiento de la planta y la adaptación a estreses abióticos, debido a que estas estructuras controlan la captación de CO_2 destinado a la fotosíntesis y la pérdida de agua por transpiración. El cierre estomático está mediado por el ácido abscísico (ABA), una fitohormona sintetizada bajo condiciones de estrés por déficit hídrico (Merlot *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2004; Cominelli *et al.*, 2005; Ding *et al.*, 2014). Otras señales que regulan la apertura estomática incluyen la luz, la humedad

Introducción

relativa atmosférica y la concentración de CO₂ (Marchadier y Hetherington, 2014). Además del control del cierre estomático, la densidad estomática también parece ser clave en la regulación de la pérdida de agua durante el estrés. Shabala *et al.* (2012) plantearon un modelo que relacionaba positivamente la reducción de la densidad estomática con el uso eficiente del agua durante el estrés salino. Más recientemente, Hepworth *et al.* (2015) sugirieron que la manipulación de la densidad estomática aumentaba la tolerancia a la sequía en *Arabidopsis thaliana*.

Como consecuencia del cierre estomático, no solo disminuye la pérdida de agua sino también la asimilación de CO₂, lo que causa una reducción de la tasa fotosintética. También produce un efecto negativo sobre el ciclo de Calvin, pues se ven afectados tanto el contenido como la actividad de Rubisco, la enzima clave en el proceso de fijación del carbono (Saibo, 2009; Pineda *et al.*, 2012). Además del control de la transpiración, existen otros mecanismos que regulan el movimiento del agua a través de la planta, y que por tanto podrían favorecer la adaptación al estrés osmótico. Es el caso de las acuaporinas, que son los principales canales proteicos implicados en el transporte de agua y algunas moléculas pequeñas a través de las membranas celulares (Maurel *et al.*, 2008; Moshelion *et al.*, 2015). La expresión de genes que codifican acuaporinas varía con la exposición a salinidad y sequía, especialmente los genes pertenecientes a las subfamilias PIP y TIP, implicadas en el transporte a través de la membrana plasmática y el tonoplasto, respectivamente (Boursiac *et al.*, 2005; Reuscher *et al.*, 2013; Qian *et al.*, 2015).

Otra estrategia de las plantas para mantener la capacidad de absorción de agua y la turgencia celular es la acumulación de solutos. Esta acumulación puede tener lugar de forma pasiva, sin gasto energético, usando iones inorgánicos. A diferencia de lo que ocurre en el estrés hídrico, donde los solutos que se captan son K⁺ y NO³⁻, en el estrés salino las plantas utilizan como solutos Na⁺ y Cl⁻. Sin embargo, cuando estos iones se acumulan en elevadas concentraciones dan lugar al efecto citotóxico de la salinidad. Por ello, la planta presenta otra estrategia alternativa, que es la biosíntesis y acumulación de solutos orgánicos. Éstos 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). Su propósito es el mismo

que el de los solutos inorgánicos: disminuir el potencial osmótico y mantener la turgencia celular. A diferencia de los anteriores, estos solutos no son tóxicos para la célula, no interfieren con el metabolismo y se pueden acumular en el citosol, donde además participan en la estabilización de proteínas y estructuras celulares. No obstante, la elevada demanda de carbono que conlleva la síntesis de osmolitos puede provocar una acumulación excesiva de N en el sistema (en forma de amonio, NH_4^+), causando toxicidad y daño celular (Oliver *et al.*, 2011). Por tanto, la regulación del metabolismo del nitrógeno y el mantenimiento del balance carbono/nitrógeno (C/N) en condiciones de estrés es crucial para el crecimiento de la planta. Un mecanismo común para evitar la toxicidad del NH_4^+ es integrarlo en las rutas metabólicas de asimilación de N (glutamina sintasa, glutamato deshidrogenasa, glutamina-oxoglutarato aminotransferasa) o almacenarlo y transportarlo como asparagina y otros compuestos ricos en N (Rabara *et al.*, 2015).

Aparte de los osmolitos, existen numerosas familias de proteínas que son sintetizadas bajo diferentes condiciones de estrés y se asocian comúnmente con la tolerancia a los mismos. Entre ellas cabe mencionar a las proteínas LEA (*Late Embryogenesis Abundant*) y las dehidrinas (que constituyen una subfamilia de proteínas LEA). Estas proteínas 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), y parecen contribuir a la preservación de la integridad estructural de la célula, actuando como chaperonas para prevenir la desnaturalización de otras proteínas (Campbell y Close, 1997; Winicov, 1998; Xiong y Zhu, 2002; Goyal *et al.*, 2005; Grelet *et al.*, 2005; Reyes *et al.*, 2005; Battaglia *et al.*, 2008; Bies-Etheve *et al.*, 2008; Muñoz-Mayor *et al.*, 2012). Existen otras proteínas de naturaleza muy diversa que se sintetizan en situaciones de estrés hídrico y salino, incluyendo osmotinas, cuya función se cree similar a la de las proteínas LEA (Tester y Davenport, 2003), proteínas de choque térmico (*Heat Shock Proteins*, HSPs), factores de transcripción, proteínas de transferencia de lípidos (LTPs), poliaminas, proteasas, fosfatasas, kinasas y enzimas involucradas en la eliminación de ROS (Serrano *et al.*, 1998; Zhang *et al.*, 2000; Bartels y Sunkar, 2005; Gill y Tuteja, 2010; Kidric *et al.*, 2014).

La biosíntesis de osmolitos y proteínas defensivas conlleva un coste energético significativo para la planta, que al final repercute negativamente en su crecimiento y desarrollo (Tester y Davenport, 2003; Mahajan y Tuteja, 2005; Bartels y Sunkar, 2005;

Introducción

Pineda *et al.*, 2012). Este fenómeno se conoce como balance desarrollo-defensa, y en su regulación juegan un papel clave las hormonas vegetales (Bari y Jones, 2009; Xia *et al.*, 2015). Además del ABA mencionado anteriormente, el ácido jasmónico o jasmonato (JA) es una hormona defensiva clave en prácticamente todas las especies vegetales, tanto en la respuesta a estreses bióticos y daño mecánico como en la respuesta a estreses abióticos, incluyendo la salinidad (Wasternack y Hause, 2013; Wasternack, 2014; Gollack *et al.*, 2014; Ismail *et al.*, 2014). La activación de la respuesta defensiva mediada por JA restringe considerablemente el crecimiento de la planta (Yang *et al.*, 2012).

La componente osmótica de la salinidad es probablemente la más importante a efectos agronómicos, no sólo porque es el efecto predominante a niveles moderados de estrés, que son los más relevantes desde un punto de vista agronómico, sino porque los mecanismos de tolerancia osmótica pueden influir en la evolución de la componente iónica del estrés (Muñoz-Mayor *et al.*, 2008; Muñoz-Mayor *et al.*, 2012). Sin embargo, pesar de su importancia, la respuesta a estrés osmótico ha recibido mucha menos atención que la fase iónica (Slama *et al.*, 2015). Estudios previos en nuestro grupo han demostrado la importancia de la fase osmótica en la tolerancia a la salinidad en tomate. Así, la sobreexpresión de *HAL1* en plantas transgénicas de tomate resultó en una muy baja absorción y transporte de Na^+ a la parte aérea en condiciones de salinidad, lo que generó un desajuste osmótico en las hojas al que las plantas hicieron frente aumentando la producción de solutos orgánicos, con un consecuente coste energético que afectó negativamente no solo al crecimiento de la planta, sino también a la producción de frutos (Muñoz-Mayor *et al.*, 2008). Por otra parte, en nuestro grupo de investigación se ha identificado recientemente el gen *ARS1*, un factor de transcripción MYB implicado en la regulación del cierre estomático, reduciendo la transpiración y con ello el transporte masivo de Na^+ a las hojas durante el estrés salino (Campos *et al.*, 2016). Además, el mutante *ars1* no solo es sensible a la salinidad sino también a la sequía, debido a una mayor pérdida de agua por transpiración.

2.2. Estrés iónico inducido por la salinidad y mecanismos de respuesta de las plantas frente a dicho estrés

El estrés iónico es el problema específico al que deben enfrentarse las plantas sometidas a estrés salino tras la fase osmótica (Hasegawa, 2013). Para la mayoría de las plantas, el

Na^+ es la causa principal de toxicidad iónica (Tester y Davenport, 2003). Este catión puede interferir con los sitios de ligamiento de K^+ , Ca^{2+} y Mg^{2+} . En consecuencia, la planta sufre una reducción del crecimiento que, en caso de extrema severidad del estrés, provocará su muerte (Tester y Davenport, 2003; Tuteja, 2007; Yeo, 2007; Munns y Tester, 2008; Shabala y Cuin, 2008; Ehsanzadeh *et al.*, 2009).

Uno de los efectos más importantes de las altas concentraciones de Na^+ es el desplazamiento del K^+ , ya que ambos iones muestran gran similitud química. Ante un estrés salino, se induce generalmente una deficiencia de K^+ debido a que el Na^+ compite con él, interfiriendo en su absorción y movimiento mediado por los transportadores de K^+ , tanto de alta como de baja afinidad (Nieves-Cordones *et al.*, 2010). Por ello, el exceso de Na^+ está implicado en la inhibición de muchos procesos metabólicos o enzimáticos como la fotosíntesis, la generación de estrés oxidativo, la absorción de CO_2 a través de los estomas y el desarrollo de la planta (Dajic, 2006; Fricke *et al.*, 2006; Shoji *et al.*, 2006; Tuteja, 2007; Munns y Tester, 2008).

El mantenimiento de la homeostasis iónica es esencial para la supervivencia de la planta frente al estrés iónico. Con independencia de su naturaleza, las plantas glicófitas y las halófitas no pueden tolerar altas concentraciones de sal en el citosol (Hasegawa, 2013). Se considera que las plantas poseen tres estrategias alternativas para hacer frente al exceso de iones salinos (Shabala *et al.*, 2014). La primera es la estrategia de ‘exclusión’, característica de las plantas glicófitas, cuya sensibilidad al Na^+ se ha asociado con la acumulación del mismo en la parte aérea, y consiste en minimizar la acumulación de iones mediante la expulsión al medio o la compartimentación en las vacuolas de la raíz. La capacidad de exclusión de Na^+ viene dada por el control del flujo neto de absorción de Na^+ (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 restringe la 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). La segunda estrategia, propia de plantas glicófitas tolerantes y halófitas, es la capacidad de ‘inclusión’ del Na^+ en los tejidos vegetales de la parte aérea, esencialmente en tallo y 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). Por último, existe una tercera estrategia característica de algunas especies halófitas, capaces de almacenar grandes cantidades de sal en células externas especializadas similares a los tricomas, conocidas como células epidérmicas vesiculares. Estas vesículas poseen un diámetro alrededor de 10 veces superior al de una célula epidérmica, y son capaces de almacenar cantidades hasta 1.000 veces superiores de Na^+ que una vacuola normal de la célula de la hoja (Shabala *et al.*, 2014).

2.3. Estrés oxidativo inducido por salinidad y sequía, y mecanismos de respuesta de las plantas frente a dicho estrés

Los estreses abióticos, entre ellos el estrés salino e hídrico, provocan en las plantas un estrés oxidativo secundario debido a la sobreacumulación de especies reactivas de oxígeno (*Reactive Oxygen Species*, ROS) (Shanker *et al.*, 2004). Cuando la planta se expone al estrés, disminuye la disponibilidad y fijación de 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 transfiere al oxígeno, generándose los ROS, entre ellos el anión superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y el radical hidroxilo ($\text{HO}\cdot$) (Smirnoff, 1993; Hernández *et al.*, 2001; Apel y Hirt, 2004). El exceso de ROS causa daños oxidativos en los 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 ROS producida por un estrés salino e hídrico, sintetizan un conjunto de moléculas antioxidantes de bajo peso molecular como ácido ascórbico, glutatión, tocoferoles y carotenoides. Además, aumentan la expresión de enzimas antioxidantes como superóxido dismutasa (SOD), catalasas (CAT), ascorbato peroxidasa (APX), glutatión S-transferasa (GST) y glutatión peroxidasa (GPX) (Xiong y Zhu, 2002; Apel y Hirt, 2004; Apse y Blumwald, 2007; Pang y Wang, 2008).

3. Genes implicados en la homeostasis de Na^+

El mantenimiento de una relación K^+/Na^+ elevada se considera un factor clave en la tolerancia al estrés salino (Colmer *et al.*, 2006; Shabala y Pottosin, 2014). Ésta puede

conseguirse reduciendo la cantidad de Na^+ en el citoplasma y aumentando la cantidad de K^+ , lo que previene el daño celular y las deficiencias nutricionales (Niu *et al.*, 1995; Serrano *et al.*, 1999). Los mecanismos dirigidos a reducir la cantidad de Na^+ en el citosol incluyen la disminución de la absorción de Na^+ por la raíz, el aumento del eflujo de Na^+ , y la compartimentación del mismo en las vacuolas.

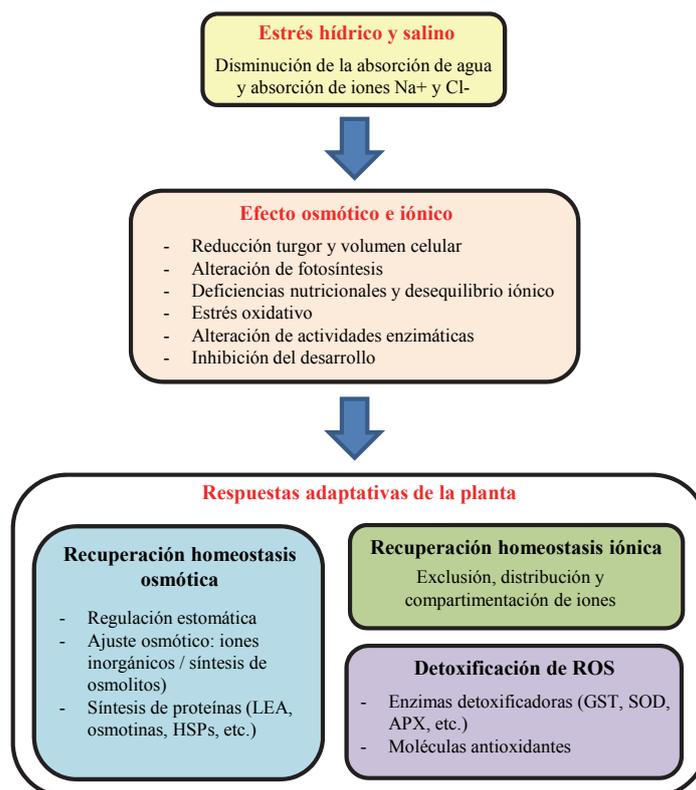


Figura 3. Representación de los efectos del estrés hídrico y salino, y respuestas adaptativas de las plantas frente a los mismos. La sequía y la salinidad causan en primer lugar un efecto osmótico, seguido de la toxicidad iónica en el caso de la salinidad. De los estreses osmótico e iónico se derivan varios efectos secundarios (estrés oxidativo, deficiencias nutricionales, alteración de la fotosíntesis y actividades enzimáticas, inhibición del desarrollo). Las plantas han desarrollado distintas respuestas adaptativas con el objetivo de recuperar la homeostasis osmótica, iónica y la detoxificación de especies reactivas de oxígeno (ROS).

3.1. Absorción de Na^+

Actualmente, se considera que la absorción del Na^+ por la planta tiene lugar a través de tres vías: la primera, 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, mientras que las otras dos rutas son de tipo simplástico y están mediadas por canales y transportadores (Tester y Davenport, 2003). En las células vegetales no se han identificado sistemas de transporte específicos de Na^+ , sino que su captación ocurre a través de distintos canales y transportadores no selectivos (Figura 4). Estos incluyen los canales de cationes no selectivos NSCC (*Non-selective cation channels*), como los activados por nucleótidos cíclicos (CNGC) y los activados por glutamato (GLR) (Leng *et al.*, 2002). Por otro lado, los transportadores de alta afinidad de K^+ de la familia KUP/HAK/KT también parecen mediar un transporte de Na^+ de baja afinidad (Santa-Maria *et al.*, 1997). Por ejemplo, AtHAK5 y AtKUP1 tienen una alta capacidad de discriminar entre K^+ y Na^+ , aunque disminuyen su actividad de transporte de K^+ en presencia de altas concentraciones de Na^+ (Fu y Luan, 1998; Rubio *et al.*, 2000; Martínez-Cordero *et al.*, 2004; Martínez-Cordero *et al.*, 2005). También AtAKT1, un canal de K^+ de la familia *Shaker* (Bertl *et al.*, 1997) tipo KIR (*K⁺ Inward-Rectifying channel*), disminuye su capacidad de transporte de K^+ en presencia de concentraciones elevadas de Na^+ (Qi y Spalding, 2004; Nieves-Cordones *et al.*, 2010; Rubio *et al.*, 2010).

Otro importante sistema de transporte de Na^+ en la planta está regulado por los transportadores de K^+ de la familia HKT (*High affinity K⁺ transporter*). Distintos estudios demostraron que la absorción de Na^+ por estos transportadores HKT tiene lugar por medio de dos mecanismos distintos que permiten su clasificación en dos subgrupos, dependiendo de si el transportador muestra preferencia por el uniporte de Na^+ (clase 1) o por el simporte de Na^+/K^+ (Clase 2) (Horie *et al.*, 2009; Yao *et al.*, 2010; Ali *et al.*, 2012).

3.2. Exclusión y transporte a larga distancia de Na^+

El exceso de Na^+ que llega al citoplasma de las células debe ser expulsado o almacenado en la vacuola. En las células maduras, ambos mecanismos se coordinan para que la entrada de Na^+ no supere la capacidad de almacenamiento. Las células meristemáticas, sin embargo, carecen de un sistema vacuolar desarrollado, por lo que en ellas el mecanismo más eficiente es la expulsión de Na^+ . La eliminación del Na^+ desde una célula podría ser perjudicial para las de su alrededor, por lo que también deben operar mecanismos que permitan la distribución coordinada del Na^+ en la planta a través del xilema y el floema, y así evitar sus efectos tóxicos (Tester y Davenport, 2003).

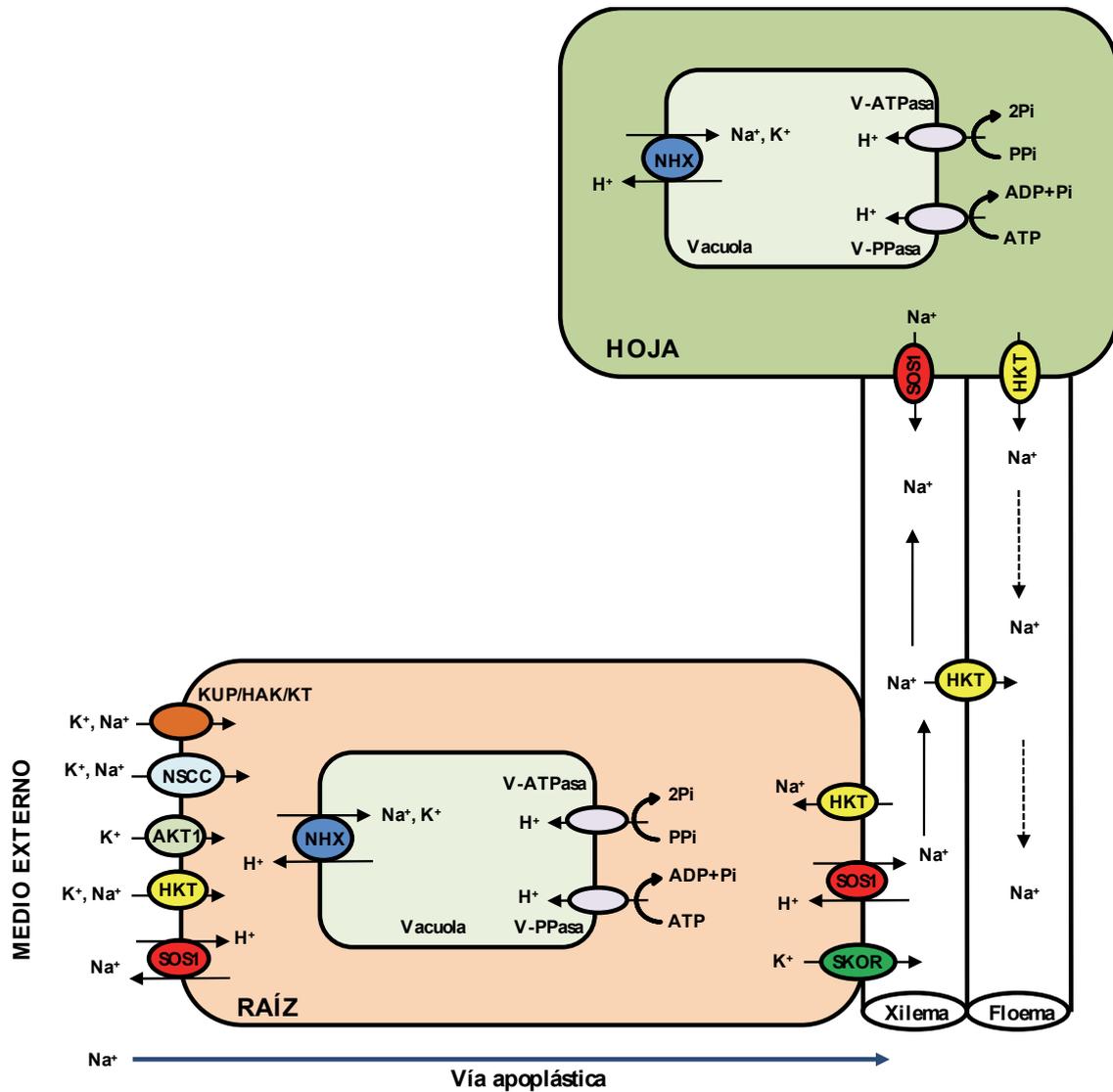


Figura 4. Principales proteínas de transporte implicadas en la absorción, transporte y compartimentación de Na^+ en la planta. El Na^+ es captado en las células de la raíz siguiendo la vía apoplástica o a través de distintos canales y transportadores de membrana, y posteriormente es transportado a lo 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^+ ; SOS1: antiportador de Na^+/H^+ ; SKOR: canal de transporte de K^+ a la parte aérea; V-ATPasa y V-PPasa: bombas de H^+ necesarias para la acción de NHX. Figura adaptada de Hanin *et al.* (2016).

El antiportador Na^+/H^+ SOS1 está implicado en la expulsión de Na^+ de la célula y su transporte 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*

Introducción

Sensitive, SOS) y forma parte de una importante ruta reguladora de la homeostasis de Na^+ y K^+ bajo condiciones salinas (Zhu, 2002; Mahajan *et al.*, 2008) (Figura 5). Esta ruta está constituida por un conjunto de proteínas entre las que se encuentra SOS1, localizado en la membrana plasmática (Shi *et al.*, 2000); SOS2, una proteína-quinasa del tipo CIPK que interacciona 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 Ca^{2+} en el citoplasma (CBL4, *Calcineurin B-like protein 4*) (Ishitani *et al.*, 2000). 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 proteína-quinasa induce la actividad del antiportador Na^+/H^+ SOS1, que limita la acumulación de Na^+ en el citoplasma (Qiu *et al.*, 2002; Quintero *et al.*, 2002).

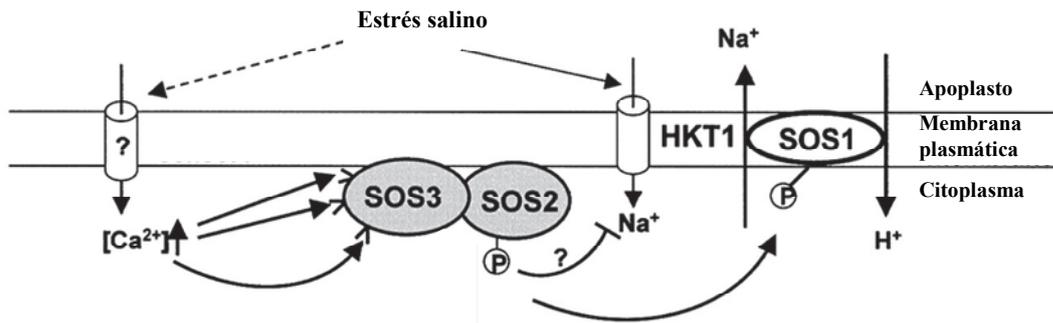


Figura 5. Representación esquemática de la ruta SOS durante el estrés salino. Ante una elevada concentración de sal externa, se dispara una señal de Ca^{2+} en el citosol que es percibida por SOS3, que a su vez interacciona específicamente con SOS2. A continuación, el complejo SOS2/SOS3 fosforila a SOS1 y así promueve el eflujo de Na^+ del citoplasma. Presumiblemente, SOS2/SOS3 también restringiría la entrada de Na^+ al citosol (por ejemplo mediante la inhibición de la actividad de HKT1). Adaptada de Chinnusamy *et al.* (2004).

SOS1 se expresa particularmente en la epidermis de la raíz y en las células del parénquima del xilema en raíces y tallos (Wu *et al.*, 1996). En el ápice de la raíz, SOS1 juega un papel crucial en la expulsión de Na^+ al medio externo para evitar su sobreacumulación, ya que las células epidérmicas radiculares están indiferenciadas y carecen de un sistema vacuolar desarrollado que les permita compartimentar el exceso de este catión. Por otra parte, en las células del parénquima que bordean al xilema, SOS1 actúa cargando el Na^+ en el xilema, regulando su transporte a larga distancia (Shi

et al., 2002). Posteriormente, la caracterización de HKT1 como transportador de Na^+ implicado en la descarga de Na^+ del xilema a las células parenquimáticas (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 en *Arabidopsis* en el que las proteínas SOS1 y HKT1 coordinarían flujos opuestos de carga y descarga de Na^+ en el xilema, regulando la homeostasis de este catión en la planta (Pardo *et al.*, 2006) (Figura 4). También se ha sugerido que la activación del complejo SOS2/SOS3, además de activar SOS1, podría estar implicada en la inhibición de HKT1, restringiendo la entrada de Na^+ al citosol (Zhu, 2002) (Figura 5).

HKT1 se considera un determinante clave de la tolerancia de las plantas al estrés salino (Platten *et al.*, 2006), ya que su actividad se ha relacionado con una menor acumulación de Na^+ en los tejidos de la parte aérea, lo que protege a las hojas de la toxicidad iónica (Ren *et al.*, 2005; Sunarpi *et al.*, 2005; Horie *et al.*, 2009; Møller *et al.*, 2009). En *Arabidopsis*, *AtHKT1;1* se expresa fuertemente en las células parenquimáticas que rodean los haces vasculares de raíces y hojas (Mäser *et al.*, 2002; Sunarpi *et al.*, 2005). Los mutantes de *AtHKT1;1* (*athkt1*) son sensibles al estrés salino y acumulan más cantidad de Na^+ en la parte aérea y menos en la raíz, lo que indica el papel de este gen en el control del transporte de Na^+ de la raíz a la parte aérea mediante la retirada o la reabsorción del Na^+ desde los vasos xilemáticos a las células parenquimáticas del xilema (Rus *et al.*, 2004; Sunarpi *et al.*, 2005; Davenport *et al.*, 2007). También se ha sugerido su participación en procesos de recirculación de Na^+ vía floemática (Berthomieu *et al.*, 2003).

En tomate, Olías *et al.* (2009) demostraron que SOS1 participa tanto en la expulsión de Na^+ al medio como en la distribución de Na^+ en los órganos vegetales, jugando un papel esencial en la tolerancia de la planta al estrés salino, ya que favorece la capacidad de retener Na^+ en tejidos como el tallo y así evita que alcance los tejidos en desarrollo. Además, como se había sugerido previamente en *Arabidopsis* (Pardo *et al.*, 2006), 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 Na^+ y K^+ (Olías *et al.*, 2009). Así, SOS1 podría mediar la transferencia del Na^+ desde el parénquima xilemático al xilema, preferencialmente en las raíces, mientras que SHKT1 mediaría el flujo inverso, es decir, la descarga de Na^+ desde el xilema a las células, favoreciendo su acumulación posterior en vacuolas (Møller *et al.*, 2009; Craig Plett y Møller, 2010). La

Introducción

acción coordinada de ambos determinaría en último término la cantidad de Na^+ que se almacena en las raíces, la que se retiene en el tallo o la que se transfiere a las hojas. En tomate, se han identificado dos isoformas del gen *HKT1*, *SIHKT1;1* y *SIHKT1;2*, siendo la isoforma *SIHKT1;2* la que juega un papel similar al de *AtHKT1;1* de Arabidopsis (Asins *et al.*, 2013; Jaime-Pérez *et al.*, 2017). Además, se ha detectado la expresión de *HKT1;2* en las células del floema, por lo que se ha sugerido que este transportador en tomate también podría estar implicado en la carga de Na^+ al floema en las hojas para su redistribución en órganos sumidero, como frutos y raíces (Asins *et al.*, 2015).

Como se ha mencionado anteriormente, se considera que el mantenimiento de un nivel de K^+ elevado durante el estrés salino es un factor clave en la tolerancia de la planta frente a dicho estrés (Colmer *et al.*, 2006; Shabala y Pottosin, 2014), siendo la relación K^+/Na^+ uno de los parámetros más usados para definir la tolerancia a salinidad (Oliás *et al.*, 2009). Por tanto, además del control de la expulsión y distribución tisular de Na^+ en la planta, la carga del K^+ en el xilema y su transporte a los tejidos de la parte aérea es crucial para el mantenimiento de la relación K^+/Na^+ en dichos tejidos. En Arabidopsis, el principal canal implicado en este proceso es SKOR (*Shaker-like outward rectifying K⁺ channel*) (Figura 4), el cual se expresa en células estelares de la raíz alrededor de los haces vasculares. El mutante *skor* contiene menos K^+ en la parte aérea que las plantas *wild-type*, mientras que el nivel de K^+ en la raíz es similar en el mutante y las plantas sin transformar (Gaymard *et al.*, 1998).

3.3. Compartimentación vacuolar de Na^+

La compartimentación del Na^+ en la vacuola es la principal estrategia para minimizar la toxicidad iónica. Dicho proceso se lleva a cabo por la acción de sistemas antiportadores Na^+/H^+ que están acoplados a un gradiente electroquímico de H^+ generado por la acción de la V-ATPasa y V-PPasa de tonoplasto (Blumwald *et al.*, 2000; Gaxiola *et al.*, 2001; Rodríguez-Rosales *et al.*, 2009). Los principales antiportadores Na^+/H^+ implicados en la acumulación de Na^+ en vacuolas son los NHX (Rodríguez-Rosales *et al.*, 2008; Rodríguez-Rosales *et al.*, 2009) (Figura 4), aunque se ha demostrado que en condiciones de crecimiento normal, con bajo contenido de Na^+ , los transportadores NHX intercambian principalmente K^+ por H^+ en lugar de Na^+ (Barragán *et al.*, 2012). Esta doble selectividad dificulta la determinación de su función exacta durante el estrés

salino, debido a su dependencia de los niveles de Na^+ y K^+ en el citoplasma (Barragán *et al.*, 2012).

En tomate, se conocen 4 isoformas de transportadores NHX, denominados LeNHX1-LeNHX4 (Venema *et al.*, 2003; Gálvez *et al.*, 2012), si bien LeNHX2 ha resultado ser el primer antiportador K^+/H^+ descrito en plantas (Venema *et al.*, 2003; Rodríguez-Rosales *et al.*, 2008). El efecto del estrés salino sobre los niveles de expresión de los genes LeNHXs ha sido estudiado en la especie silvestre *S. pimpinelifolium* y en tomate cultivado, observándose niveles de expresión similares en ambas especies en ausencia de estrés, mientras que el estrés salino indujo un incremento en la expresión de las isoformas *LeNHX3* y *LeNHX4*, especialmente en la especie silvestre tolerante. Este incremento de expresión estaba correlacionado con el mayor contenido de Na^+ en plantas de la especie tolerante respecto a la cultivada en estrés salino, lo que indica que los transportadores NHX son importantes determinantes de la tolerancia a la salinidad en tomate (Gálvez *et al.*, 2012).

4. Mejora genética de tomate

El tomate posee un genoma diploide ($2n=24$), con un tamaño aproximado de 950 Mb organizado en 12 cromosomas, y contiene alrededor de 35.000 genes (The Tomato Genome Consortium, 2012). Dentro de la familia de las Solanáceas, el tomate es considerado una especie modelo tanto para investigación básica como aplicada (Bergougnoux, 2014; Schwarz *et al.*, 2014). Ofrece ventajas como son un genoma de tamaño reducido con respecto a otros cultivos, tiempos de generación cortos, autogamia y facilidad de transformación genética. Por ello, ha sido posible obtener gran cantidad de información del tomate, en forma de recursos genéticos, citogenéticos y fisiológicos. En el año 2004 se inició el proyecto de secuenciación del genoma de tomate, llevado a cabo por un consorcio internacional (*The Tomato Genome Consortium*) formado por Corea del Sur, China, Inglaterra, India, Holanda, Francia, Japón, España, Italia y EEUU. El proyecto culminó en 2012 con la publicación de la secuenciación del cultivar ‘Heinz 1706’, cuya información puede consultarse en la base de datos SGN (*Solanaceae Genome Network*; <https://solgenomics.net/>).

Introducción

El tomate es una de las especies en las que se ha realizado mayor inversión en mejora genética, y se han conseguido grandes avances en las últimas décadas. Históricamente, los programas de mejora genética se han orientado a obtener altos rendimientos, con frutos de alta calidad organoléptica y nutricional, minimizando en lo posible los costes de producción. Además, los cultivares disponibles actualmente disponen de resistencias a numerosos patógenos, la mayoría de las cuales provienen de especies silvestres emparentadas con tomate (Bai y Lindhout, 2007). Por otro lado, el desarrollo de cultivos tolerantes a estreses abióticos es un objetivo de mejora prioritario. Gran parte de la producción de tomate en nuestro país se obtiene en áreas sometidas a problemas de sequía y salinidad (especialmente Andalucía y Murcia). Por tanto, los programas de mejora que permitan incrementar la tolerancia a la sequía y salinidad de tomate repercutirán positivamente en la economía de estas zonas productoras.

Un programa de mejora eficiente requiere de la disponibilidad de fuentes de diversidad genética en la especie además de la capacidad de heredabilidad de los caracteres de interés. La mejora tradicional o clásica consiste en el cruce de variedades de élite seleccionadas de la misma especie o el cruce de un cultivar de élite y una especie próxima filogenéticamente. La obtención de nuevas variedades mediante esta estrategia es muy laboriosa, siendo la elección de los parentales un paso fundamental, para lo que se necesita un adecuado conocimiento del material disponible en el germoplasma (Causse *et al.*, 2006). En el caso del tomate, se han recolectado y catalogado más de 83.000 accesiones que han sido cuidadosamente conservadas en bancos de semillas repartidos por todo el mundo (Bauchet y Causse, 2012; Schwarz *et al.*, 2014).

El desarrollo de la biología molecular y la genómica ha ofrecido a los mejoradores una herramienta eficaz para la mejora genética basada en la selección asistida por marcadores moleculares. El desarrollo de los marcadores moleculares ha permitido la construcción de mapas genéticos de alta densidad en el genoma del tomate, facilitando la disección de los caracteres cuantitativos en QTLs y abriendo el camino al mapeo físico y al clonaje molecular de los factores genéticos responsables de dichos caracteres (Causse *et al.*, 2006; Bauchet y Causse, 2012; Capel *et al.*, 2015; Capel *et al.*, 2017). Finalmente, la secuenciación completa del genoma del tomate ha supuesto un gran avance hacia el conocimiento de las bases genéticas y moleculares que regulan el desarrollo, la maduración del fruto, y las respuestas a distintos tipos de estrés (The Tomato Genome Consortium, 2012).

Por otro lado, el desarrollo de la ingeniería genética en las últimas décadas ha permitido superar la barrera de la capacidad de entrecruzamiento interespecífico, lo que no es posible en mejora clásica. Así, un carácter específico puede introducirse fácilmente en un cultivar de interés agronómico mediante transformación vegetal y regeneración *in vitro* de plantas transformadas, en unos periodos de tiempo mucho más breves de los que requiere la mejora clásica o la asistida por marcadores (Bergougnoux, 2014).

Finalmente, las tecnologías de edición genómica han revolucionado la ingeniería genética en los últimos años, especialmente el sistema CRISPR-Cas9. Este sistema consta de la nucleasa Cas9 y un RNA guía que se dirige a la secuencia genómica de interés, permitiendo la modificación del DNA de forma rápida, directa y precisa, incluso de múltiples genes simultáneamente (Cong *et al.*, 2013; Voytas y Gao, 2014). Esta técnica novedosa se ha utilizado con éxito no solo en plantas modelo sino también en especies de interés agronómico, como tomate, arroz, trigo, maíz o patata (Voytas y Gao, 2014; Schaart *et al.*, 2016). En tomate, CRISPR-Cas9 se ha aplicado con éxito para obtener frutos partenocárpicos (Ueta *et al.*, 2017) o enriquecidos en licopeno (Li *et al.*, 2018).

4.1. Especies silvestres relacionadas con tomate y su importancia como fuente de variabilidad genética

Actualmente se reconocen trece especies de tomate (Knapp y Peralta, 2016), incluyendo al tomate cultivado (*Solanum lycopersicum*), que es la única especie domesticada, y 12 especies afines más. Dichas especies silvestres están distribuidas en los Andes desde la zona central de Ecuador hasta el norte de Chile, y dos de ellas son endémicas de las Islas Galápagos (Tabla 2).

Las especies silvestres de tomate representan un importante recurso genético en la mejora de tomate cultivado debido a su enorme diversidad genética, incluyendo caracteres de interés agronómico (Tabla 3). Entre las características más interesantes que muestran las especies silvestres de tomate se encuentran la resistencia a diferentes tipos de estrés, tanto bióticos (plagas, enfermedades, malas hierbas, etc.) como abióticos (sequía, salinidad, temperaturas extremas, problemas de suelo, etc.) (Cuartero *et al.*, 1995). Como ejemplo, cabe destacar la gran tolerancia a la salinidad y sequía en especies como *S. pennellii*, que crece en hábitats extremadamente secos del Perú

Introducción

Occidental. Otras, como *S. habrochaites*, pueden tolerar el frío y las heladas, mientras que variedades de la forma silvestre de *S. lycopersicum* L. *cerasiforme* poseen tolerancia a la humedad (Esquinas-Alcázar, 1981; Bolarín *et al.*, 1991).

Tabla 2. Especies de tomate y su distribución geográfica. Adaptado de Peralta *et al.* (2005).

Nombre de la especie	Distribución
<i>Solanum arcanum</i>	Valles andinos costeros e interiores en Perú, entre 100-2.500 m
<i>Solanum cheesmaniae</i>	Endémico de las Islas Galápagos, Ecuador, desde el nivel del mar hasta 500 m.
<i>Solanum chilense</i>	Ladera occidental de los Andes entre Perú y Chile, llanuras rocosas hiperáridas y desiertos costeros desde el nivel del mar hasta 2.000 m
<i>Solanum chmielewskii</i>	Valles andinos secos elevados desde entre Perú y Bolivia, entre 2.300-2.880 m de cota
<i>Solanum corneliumuelleri</i>	Elevaciones medias a altas en la ladera occidental de los Andes del centro al sur de Perú, ocasionalmente en laderas más bajas, 400 - 3.000 m
<i>Solanum galapagense</i>	Endémico de las Islas Galápagos, Ecuador
<i>Solanum habrochaites</i>	Pendientes occidentales de los Andes desde el centro de Ecuador hasta el centro de Perú, cota alrededor de 500-2500 m
<i>Solanum huaylasense</i>	Laderas rocosas en Perú
<i>Solanum lycopersicum</i>	Formas cultivadas, a nivel mundial en gran variedad de hábitats. <i>S. lycopersicum</i> var. <i>cerasiforme</i> es el único <i>Lycopersicum</i> silvestre que crece como mala hierba en regiones tropicales y subtropicales americanas
<i>Solanum neorickii</i>	Perú y Ecuador, en valles interandinos secos desde 1.950-2.600 m. A menudo sobre bancos rocosos y bordes de carreteras
<i>Solanum pennellii</i>	Perú y Chile, en laderas rocosas secas y áreas arenosas desde el nivel del mar hasta 3.000 m
<i>Solanum peruvianum</i>	Lmas y ocasionalmente desiertos costeros desde el centro de Perú al norte de Chile, desde nivel del mar hasta 600 m
<i>Solanum pimpinellifolium</i>	Áreas costeras desde el centro de Ecuador hasta el centro de Chile, 0-500 m

Todas las especies silvestres de tomate se pueden hibridar mediante cruzamiento con el tomate cultivado con mayor o menor eficiencia, y siempre y cuando este último se utilice como receptor de polen (Bedinger *et al.*, 2011). Se estima que los cultivares de élite contienen únicamente un 5% de la variabilidad genética total entre las especies de tomate (Miller y Tanksley, 1990). Esto se debe principalmente a las selecciones producidas durante la domesticación y al alto grado de endogamia que se ha alcanzado durante el desarrollo de los cultivares modernos (Ladizinsky, 1985), puesto que la

mejora se ha centrado normalmente en el aumento del rendimiento en condiciones óptimas de cultivo. Por tanto, una estrategia interesante para mejorar el rendimiento de los cultivos actuales en condiciones adversas es la identificación de los determinantes de tolerancia a distintos estreses en las especies silvestres, puesto que están adaptadas al crecimiento en hábitats extremos, y eventualmente la transferencia de estos determinantes a las especies cultivadas filogenéticamente relacionadas.

Tabla 3. Características agronómicas de interés de las especies silvestres de tomate. Adaptado de Prohens *et al.* (2008).

Especie	Características de interés
<i>S. lycopersicum</i> var. <i>cerasiforme</i> L.	Tolerancia humedad, resistencia a hongos y problemas del suelo.
<i>S. cheesmaniae</i> y <i>S. galapagense</i>	Tolerancia a salinidad y espesor del pericarpio.
<i>S. pimpinellifolium</i>	Color y calidad del fruto, resistencia a patógenos
<i>S. chmielewskii</i>	Alto contenido de azúcares
<i>S. neorickii</i>	Resistencia a bacterias
<i>S. habrochaites</i>	Tolerancia a frío y heladas, resistencia a insectos y patógenos
<i>S. pennellii</i>	Resistencia a sequía, salinidad e insectos
<i>S. chilense</i>	Resistencia a sequía y plagas
<i>S. peruvianum</i> , <i>S. huaylasense</i> , <i>S. arcanum</i> , <i>S. corneliomuelleri</i>	Resistencia a virus, hongos y bacterias

5. Análisis de mutantes como herramienta para la identificación de genes con un papel relevante en la tolerancia de tomate a sequía y salinidad

Una de las estrategias más utilizadas para estudiar los mecanismos de tolerancia a estreses abióticos y los genes implicados en estos es el análisis de mutantes (Kuromori *et al.*, 2009, Giménez *et al.*, 2010; Atkinson y Urwin, 2012). Esta aproximación tiene dos ventajas fundamentales: en primer lugar, la identificación de un mutante indica que el gen afectado 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

Introducción

inferir la función del gen alterado. Una de las estrategias más utilizadas en los últimos años para la generación de colecciones de mutantes es la mutagénesis insercional con T-DNA, la cual se ha aplicado tanto en *Arabidopsis* (O'Malley y Ecker, 2010; Ghedira *et al.*, 2013; Wilson-Sánchez *et al.*, 2014) como en otras especies de interés agronómico, entre ellas arroz, maíz y soja (Jeon *et al.*, 2000; Mathieu *et al.*, 2009; Yi *et al.*, 2009). En tomate, también se generó una colección de líneas T-DNA generadas a partir del cv. Micro-Tom (Mathews *et al.*, 2003), pero no se trataba un cultivar de interés comercial.

En el proyecto coordinado en el que se enmarca esta tesis doctoral, fruto de una colaboración establecida entre tres grupos de investigación dirigidos por la Prof. M^a Carmen Bolarín (CEBAS-CSIC), el Prof. Vicente Moreno (IBMCP-UPV) y el Prof. Rafael Lozano (Universidad de Almería), se obtuvo la primera colección de mutantes insercionales en un cultivar comercial de tomate (cv. MoneyMaker) y una accesión de la especie silvestre *Solanum pennellii* (PE47) (Atarés *et al.*, 2011; Pérez-Martín *et al.*, 2017). Gracias al escrutinio de esta colección, se han identificado y caracterizado algunos genes clave implicados en la respuesta a salinidad en tomate, como el gen *ARSI*, que codifica el primer factor de transcripción de tipo R1-MYB identificado en tomate implicado en la regulación de la apertura estomática durante el estrés salino, limitando la cantidad de Na⁺ transportado a las hojas (Campos *et al.*, 2016), y más recientemente el gen *CBL10*, que codifica para una proteína tipo CBL implicada en la homeostasis de Na⁺ y Ca²⁺ en los tejidos en desarrollo (Egea *et al.*, 2018a).

Sin embargo, no todos los mutantes con un fenotipo de interés identificados en esta colección son insercionales sino que pueden ser de tipo somaclonal, como consecuencia de alteraciones derivadas del proceso de regeneración *in vitro* de las plantas transformadas (Mohan Jain, 2001; Bairu *et al.*, 2011; Wang y Wang, 2012), con lo cual el gen alterado no queda etiquetado por el inserto T-DNA. A pesar de la mayor dificultad para identificar el gen alterado en este tipo de mutantes, el interés fenotípico de algunos de ellos y, por tanto, la presumible importancia del gen responsable de dicho fenotipo, nos ha llevado a continuar su caracterización y abordar la identificación del gen mediante estrategias alternativas de mapeo por secuenciación (*mapping-by-sequencing*) (Fernández-Lozano *et al.*, 2015). Es el caso de los mutantes estudiados en esta tesis doctoral: el mutante *pennellii salt hypersensitive (psh)* de *S. pennellii* (Capítulo I), y el mutante *restored cell structure by salinity (res)* de *S. lycopersicum* (Capítulo II).

OBJETIVOS

II. OBJETIVOS

En esta Tesis Doctoral se han abordado los siguientes objetivos:

1. Caracterización de la respuesta fenotípica, fisiológica y molecular de la especie silvestre *Solanum pennellii* a los estreses hídrico y salino

1.1. Identificación de los mecanismos clave de la respuesta a estrés hídrico en la especie silvestre tolerante *S.pennellii*, y los genes que regulan dicha respuesta.

1.2. Identificación de los mecanismos clave y genes implicados en la tolerancia al estrés salino en *S. pennellii*.

1.3. Caracterización a nivel fenotípico, fisiológico y molecular el mutante *pennellii salt hypersensitive* (*psh*).

2. Análisis transcriptómico del mutante de tomate *res* (*restored cell structure by salinity*) e identificación del gen responsable del fenotipo mutante

2.1. Identificación de las bases moleculares del balance desarrollo - estrés mediante el análisis comparativo del transcriptoma del mutante *res* respecto al cultivar *wild-type* (cv. Moneymaker), tanto en ausencia de estrés como en estrés salino.

2.2. Identificación del gen mutado responsable del fenotipo *res* y caracterización de su función en tomate.

MATERIALES Y MÉTODOS

III. MATERIALES Y MÉTODOS

1. Material vegetal

El material vegetal utilizado en esta tesis doctoral ha sido el siguiente:

- 1) Tomate cultivado (*Solanum lycopersicum* L. cv. Moneymaker). Se trata de un cultivar de élite de crecimiento generalmente indeterminado y frutos esféricos de tamaño mediano.
- 2) Especie silvestre *Solanum pennellii* (accesión PE47). Esta especie es endémica de las regiones andinas de Sudamérica y presenta una elevada tolerancia a estreses abióticos, como sequía y salinidad (Bolarín *et al.*, 1991; Santa-Cruz *et al.*, 1999). Debido a ello, y a su cercanía filogenética con el tomate cultivado, es una especie de interés en programas de mejora genética.
- 3) Mutante *pennellii salt hypersensitive* (*psh*) obtenido en el fondo genético de *S. pennellii* accesión PE47. Este mutante fue identificado previamente al inicio de esta tesis (Plasencia-Martínez, 2015) y en el presente trabajo se ha ampliado su caracterización fenotípica y molecular.
- 4) Mutante *restored cell structure by salinity* (*res*) obtenido en el fondo genético de *Solanum lycopersicum* cv. Moneymaker. Este mutante se identificó con anterioridad a esta tesis doctoral (García-Abellán *et al.*, 2015) y en este trabajo se ha completado su caracterización molecular y la identificación del gen responsable del fenotipo mutante.

Los mutantes estudiados en esta tesis forman parte de una colección obtenida a partir de la transformación genética del cultivar de tomate Moneymaker y la especie silvestre *S. pennellii* PE47 (Atarés *et al.*, 2011; Pérez-Martín *et al.*, 2017), en el marco de un proyecto coordinado entre nuestro grupo de investigación dirigido por la Prof. M^a Carmen Bolarín (CEBAS-CSIC), el grupo del Prof. Vicente Moreno (IBMCP-UPV-CSIC) y el grupo del Prof. Rafael Lozano (Universidad de Almería).

2. Condiciones de cultivo de plantas

Todas las semillas utilizadas en los distintos ensayos se pusieron a germinar en oscuridad, en una mezcla de turba negra y perlita en proporción 8:3 distribuida en semilleros de plástico de dimensiones 60 x 40 x 12 cm y 96 pocillos, y en condiciones

Materiales y métodos

de temperatura y humedad de 28°C y 90%, respectivamente. Después de la germinación, las plantas se cultivaron en una cámara de cultivo en condiciones controladas de humedad relativa (entre 50% y 80%), temperatura (máxima de 26°C y mínima de 18°C) y fotoperiodo (16 horas de luz y 8 horas de oscuridad). Las condiciones de intensidad de luz y temperatura se ajustaron de forma cíclica mediante un sistema informático para tratar de reproducir un ciclo natural (Tabla 4).

Tabla 4. Parámetros ambientales programados en la cámara de cultivo de condiciones controladas.

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

Las plantas se mantuvieron en los semilleros hasta que alcanzaron un desarrollo de 1-2 hojas verdaderas, momento en el que se transfirieron al medio de cultivo definitivo donde se realizó el ensayo (sustrato o cultivo hidropónico). En cualquiera de los casos, la disolución nutritiva utilizada fue Hoagland diluida al 50% (Hoagland y Arnon, 1950), cuya composición se muestra en la Tabla 5.

Tabla 5. Composición de la disolución nutritiva Hoagland diluida al 50% (Hoagland y Arnon, 1950), cuyos componentes se distribuyen en tres soluciones diferentes que se mezclan en volúmenes equivalentes para obtener la disolución de riego final.

Solución A	g L^{-1}
NH_4NO_3	8,0
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	82,6
KNO_3	35,7
Solución B	g L^{-1}
KNO_3	5,0
KH_2PO_4	27,4
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	24,6
$\text{MnSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,053
H_3BO_3	0,140
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,015
$(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0,008
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,060
Hierro (Fe)	g L^{-1}
Fe-EDDHA 6%	1,87

2.1. Cultivo en sustrato

Las plantas del semillero se transfirieron individual o conjuntamente a macetas de distinta capacidad (1 L, 1,5 L, 3 L o 10 L) dependiendo del ensayo, con la mezcla de turba negra y perlita en proporción 8:3 previamente humedecida con solución Hoagland al 50%. Una vez las plantas se aclimataron y alcanzaron el estado de desarrollo deseado, se aplicó el tratamiento (estrés hídrico o salino).

2.2. Cultivo hidropónico



Figura 6. Aspecto general del sistema de cultivo hidropónico.

El sistema hidropónico (Figura 6) consta de seis cubetas de fibra de vidrio con una capacidad de 50 litros de disolución nutritiva (dimensiones 219 x 20 x 17 cm). Las cubetas se cubrieron con tapaderas perforadas, también de fibra de vidrio, donde se situaron las plantas sobre unos soportes de plástico perforados rellenos de algodón acrílico o miraguano sintético con el fin de sujetar las plantas y mantenerlas erguidas. Una vez transferidas al sistema hidropónico, las plantas se mantuvieron en disolución Hoagland diluida al 50% (condición control) durante un mínimo de 10 días antes de iniciar el tratamiento salino, con el fin de favorecer la aclimatación de las plantas y el desarrollo del sistema radicular. La disolución nutritiva se aireaba continuamente mediante un burbujeo continuo suministrado por un compresor (Puska N-150-50, con un caudal de 115 L min⁻¹, una presión máxima de 10 kg cm⁻² y una capacidad de 50 L). Para garantizar unas condiciones óptimas de cultivo, se realizaron controles periódicos

Materiales y métodos

de la disolución nutritiva mediante un seguimiento del pH, la conductividad eléctrica y el análisis del contenido de iones, procediéndose a la renovación de la disolución al menos una vez por semana. El tratamiento salino se aplicó cuando las plantas alcanzaron un estado de desarrollo de 4-5 hojas completamente desarrolladas, y consistió en disolución Hoagland al 50% más una concentración de 100 o 200 mM NaCl dependiendo del material vegetal.

2.3. Cultivo en condiciones de invernadero para la obtención de semillas



Figura 7. Cultivo de plantas en el invernadero.

Para la obtención de las líneas homocigotas de los mutantes, las plantas con fenotipo mutante previamente identificadas en poblaciones segregantes se cultivaron en un invernadero situado en la finca experimental “Tres caminos” del CEBAS, situada en La Matanza, término municipal de Santomera (Murcia). El invernadero, completamente cerrado, constaba de una superficie de aproximadamente 1.000 m² y un sistema de refrigeración para la regulación de la temperatura, formado por un módulo de humectación en un extremo del invernadero y seis extractores en el otro extremo con persianas de apertura-cierre automático por sistema mecánico (centrifugo de empuje), que se activaba cuando la temperatura superaba los 24°C. El sustrato utilizado para el cultivo en invernadero era fibra de coco en contenedores de poliestireno expandido con

un volumen de 32 L (Figura 7). Las plantas se entutoraban con hilo de rafia y anillas, y se les eliminaban periódicamente las yemas laterales.

La solución nutritiva (Tabla 6), con unos niveles óptimos de fertilización para el cultivo de tomate (Cadahia, 1995), se suministraba mediante riego por goteo con un caudal de 3 L h⁻¹. El marco de plantación era de 0,5 x 2 m² con un gotero cada dos plantas. Se disponía de tres depósitos de 2.000 L 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 nítrico para regular el pH de la disolución de riego. 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 equipo automático, variando las condiciones según la edad de la planta y las condiciones ambientales. El agua de riego tenía una conductividad eléctrica alrededor de 1 dS m⁻¹, y la disolución de riego en control 2 dS m⁻¹.

Tabla 6. Composición de la disolución nutritiva empleada para el riego de las plantas en el invernadero.

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

Las plantas de los mutantes cultivadas en estas condiciones se autopolinizaron para obtener semillas, y la fijación de la mutación se comprobó mediante el análisis fenotípico de las plantas descendientes.

3. Análisis fisiológicos

3.1. Desarrollo de biomasa

A lo largo de los distintos ensayos, se estimó el crecimiento de las plantas mediante la determinación del peso fresco o desarrollo de biomasa. Para ello, durante los muestreos del material vegetal, cada planta se separaron en parte aérea y raíz y se pesaron separadamente en una balanza de precisión, obteniéndose el peso fresco (PF) o biomasa fresca. El crecimiento medio se calculó siguiendo la siguiente fórmula:

$$\text{Crecimiento medio} = (PF_2 - PF_1) / (t_2 - t_1)$$

PF₁ y PF₂ son el peso fresco de parte aérea o raíz en las plantas muestreadas en el tiempo 1 y 2, respectivamente, y t₁ y t₂ corresponden al tiempo en el que se realizaron los muestreos 1 y 2. Una vez obtenido el peso fresco de la parte aérea completa, se separaron folíolos y tallos, y se obtuvo el peso fresco de cada tejido por separado.

3.2. Contenido de agua

Una vez pesado el material vegetal fresco, se introducía en una estufa a 70°C durante 48-72h hasta la completa deshidratación y se volvían a pesar nuevamente para obtener el peso seco (PS) o biomasa seca. A continuación, el contenido de agua de los diferentes tejidos se obtuvo mediante la siguiente relación:

$$\text{Contenido de agua} = (PF - PS) / PS$$

Donde PF y PS son el peso fresco y seco en gramos, respectivamente, del tejido en cuestión. En algunos ensayos también se expresó como porcentaje de agua respecto al día 0 (ausencia de estrés). Por otra parte, el contenido relativo de agua se obtuvo según la fórmula:

$$\text{Contenido relativo de agua} = (PF - PS) / (PSat - PS)$$

Donde PF y PS son el peso fresco y seco del tejido, y PSat es el peso de saturación obtenido mediante la rehidratación del tejido durante 24h con agua destilada.

Una vez secados los tejidos, se homogeneizaron en un molinillo de bolas y se almacenaron en envases de plástico guardados en desecadores para evitar su rehidratación hasta la realización de posteriores análisis.

3.3. Agua transpirada y pérdida de agua en folíolos escindidos

La pérdida de agua global (o agua transpirada) durante los ensayos de estrés hídrico se determinó como la evolución del peso del conjunto maceta-planta durante el ciclo de deshidratación respecto al control (día 0) y se expresó como porcentaje del peso inicial (%). Para analizar la pérdida de agua de los folíolos, se escindieron dos folíolos de la 1ª hoja completamente desarrollada de cada planta y se siguió la evolución de la pérdida de peso cada hora durante las primeras 6 horas, y tras 24 horas desde la escisión. La pérdida de agua de los folíolos se expresó como el porcentaje de pérdida de peso respecto del peso inicial.

3.4. Parámetros de intercambio gaseoso: conductancia estomática (g_s), tasa de transpiración foliar (E), y tasa de fotosíntesis neta (A)

La conductancia estomática y la transpiración foliar son importantes indicadores del estrés de las plantas, aportando información sobre la regulación estomática y reflejando la pérdida de agua de la hoja a través de los estomas y de la cutícula. Para la medida de estos parámetros fisiológicos, se empleó una técnica no destructiva utilizando un sistema portátil de medida de fotosíntesis (CIRAS-2, PP-system, Amesbury, MA 01913 EEUU). Las condiciones de trabajo del equipo CIRAS-2 fueron las siguientes: la superficie foliar de medida fue de $1,7 \text{ m}^2$, el nivel de CO_2 de referencia fue 480 ppm, la temperatura de la hoja en la cámara variaba entre $25,7$ y $26,8^\circ\text{C}$, la velocidad del flujo de gas de la hoja en la cámara de medición era de $195 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$, 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 $500 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$. En estas condiciones de trabajo, se determinaron en la 1ª hoja completamente desarrollada de plantas intactas: la conductancia estomática (g_s : $\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2}\text{s}^{-1}$), parámetro que estima el grado de apertura/cierre estomático mediante la tasa de entrada de CO_2 /salida de H_2O por los estomas, la tasa de transpiración foliar (E: $\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2}\text{s}^{-1}$), y la tasa de fotosíntesis o asimilación de CO_2 (A, $\mu\text{mol CO}_2\cdot \text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$). Las medidas en distintos días se realizaban siempre a la misma hora, con el fin de eliminar las posibles variaciones en estos

parámetros debidas al ciclo circadiano de las plantas y no a la condición experimental, y se llevaba a cabo sobre hojas con un grado de desarrollo similar.

3.5. Termografía infrarroja

La termografía infrarroja (TI) es una técnica no destructiva cuyo uso en la monitorización de la pérdida de agua por transpiración se ha extendido en los últimos años (Wang *et al.* 2004; Grant *et al.* 2006; Sirault *et al.*, 2009; Liang *et al.*, 2010). A pesar de ser una medida indirecta, pues se realiza sin contacto directo con la superficie foliar, ha surgido como una alternativa fiable frente a otras técnicas invasivas como los analizadores de intercambio gaseoso, los cuales podrían interferir con el comportamiento natural de la hoja (Jones, 1999; Sirault *et al.*, 2009). Las medidas de TI se obtuvieron mediante una cámara infrarroja FLIR T420BX (FLIR Systems, Wilsonville, EEUU), equipada con una lente de 10 mm. Los parámetros de la cámara fueron los siguientes: campo de visión ajustado a 45°, emisividad de la hoja a 0,95, y temperatura (T^a) reflejada de 20°C. La adquisición de imágenes se realizó periódicamente (durante horas o días dependiendo del experimento) colocando la cámara en posición perpendicular a las plantas y aproximadamente 50 cm por encima de la superficie de las hojas. Tras la adquisición de imágenes, se obtuvieron los datos de T^a media de la 1ª hoja desarrollada utilizando el programa FLIR ResearchIR[™] y se calculó la variación de la T^a foliar de cada planta mediante la relación:

$$\text{Variación de } T^a \text{ foliar} = (T_x^a - T_0^a)$$

T_x^a representa la T^a media de la 1ª hoja desarrollada de las plantas sometidas a un tiempo determinado de estrés (x = horas o días de estrés), y T_0^a representa la T^a media de la 1ª hoja de las plantas cultivadas en ausencia de estrés (control).

3.6. Determinación del contenido de clorofila y eficiencia fotosintética (F_v/F_m)

El contenido en clorofila se analizó en la 1ª hoja completamente desarrollada de las plantas mediante un dispositivo portátil SPAD-502 (Minolta, Kyoto, Japón). Este dispositivo permite calcular de forma semi-cuantitativa el contenido de clorofila mediante la medida de la fluorescencia de la clorofila a dos longitudes de onda distintas: una a la que absorbe la clorofila (650 nm, longitud de onda fotosintéticamente activa) y a otra a la que no absorbe (940 nm) y que permite compensar el grosor de la

hoja (Ling *et al.*, 2011). El contenido en clorofila se expresó en unidades relativas SPAD (Soil Plant Analysis Development), parámetro descrito por Hoel y Solhaug (1998), que se relaciona directamente con el contenido en clorofila de la hoja.

Para la determinación de la eficacia fotoquímica del fotosistema II se utilizó un fluorímetro portátil OS-30p (ADC BioScientific, Reino Unido). Este equipo determina la eficiencia fotoquímica máxima del fotosistema II, estimada según la siguiente fórmula:

$$F_v / F_m = (F_m - F_0) / F_m$$

F_v / F_m es la relación entre la fluorescencia variable y la fluorescencia máxima, el máximo rendimiento cuántico del fotosistema II. F_m es la máxima intensidad de fluorescencia en hojas adaptadas a la oscuridad durante 30 minutos inducida por una fuente de excitación de luz roja lejana ($3.000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) durante 0,8 segundos. F_0 representa la intensidad de fluorescencia mínima producida por la exposición de la hoja a una fuente de luz actínica ($400 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) (Maxwell y Johnson, 2000). Estos parámetros se emplean rutinariamente para evaluar el efecto de un estrés sobre la maquinaria fotosintética de las plantas (Sayed, 2003). Tanto en este análisis como en el del contenido de clorofila, se tomaron tres medidas en áreas distintas de la 1ª hoja desarrollada de cada planta, y se obtuvo el valor promedio en cada caso.

3.7. Determinación del índice de peroxidación de lípidos mediante la producción de malondialdehído (MDA)

El método descrito, comúnmente llamado TBARS (método de las sustancias reactivas del ácido tiobarbitúrico), es una modificación del protocolo descrito en Martínez-Solano *et al.* (2005). Se pesaron aproximadamente 0,5 g de material descongelado de folíolos de la 1ª hoja desarrollada y se homogeneizaron en un Polytron (Kinematica AG, Suiza) con 4,0 mL de ácido tricloroacético 0,1% (TCA). A continuación, las muestras se centrifugaron a 15.000 g durante 10 min a 20°C. Se tomaron 0,5 mL del sobrenadante y se transfirieron a un tubo Eppendorf de 2,0 mL en el que se practicaron dos agujeros en la tapa, añadiendo después 1,5 mL de ácido 2 tio-barbitúrico 0,5% (TBA) en 20% TCA. Los tubos se incubaron en un baño a 90°C en agitación durante 30 min. Posteriormente, se detuvo la reacción de formación de malondialdehído (MDA) introduciendo los tubos Eppendorf en hielo durante 5 min. Seguidamente, las muestras se centrifugaron a 1.000

Materiales y métodos

g durante 5 min a 4°C y se recuperó 1 mL del sobrenadante, en el que se midió la absorbancia a las longitudes de onda de 532 y 600 nm utilizando como referencia el reactivo 0,5% TBA en 20% TCA. La fórmula para calcular la producción de MDA es la siguiente:

$$\mu\text{mol MDA}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{h}^{-1} = (2\cdot(m+V)\cdot\Delta\text{Abs})/(m\cdot b\cdot E)$$

donde ‘m’ es el peso fresco (g) del tejido tomado para el análisis, ‘V’ es el volumen de extractante utilizado en el ensayo (0.1% TCA), ‘b’ es el camino óptico de la cubeta del espectrofotómetro (por regla general es 1 cm), ‘E’ es el coeficiente de extinción molar del MDA ($155\text{ mM}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$), ‘ ΔAbs ’ es la diferencia entre la absorbancia medida a 532 nm y a 600 nm. La absorbancia específica del MDA es a 532 nm, mientras que la medida a 600 nm es de interferentes; la sustracción de valores de absorbancias a dichas longitudes de onda elimina el efecto de dichos interferentes. El ‘2’ se debe al tiempo de reacción que en el protocolo es media hora, y aparece en la fórmula para poder expresar la producción de MDA por hora. Tras el cálculo, los resultados se expresaron en nmol MDA·g⁻¹·h⁻¹ multiplicando el valor resultante de aplicar la fórmula anterior por 1000.

3.8. Contenido de iones inorgánicos

Para analizar el contenido de cationes, se obtenían extractos digeridos de aproximadamente 0,1 g de material vegetal seco y molido (raíces, tallos y hojas). Dicho material vegetal se depositaba en un tubo de vidrio al que se añadían 3 mL de una disolución HNO₃:HClO₄ en proporción 2:1, tras lo cual se introducía en un digestor Block Digest (Selecta, España) durante 8 horas a 190°C. Cuando el material estaba totalmente digerido (indicado por la apariencia translúcida de la disolución) se retiraban las muestras del digestor y, una vez enfriadas a temperatura ambiente, se enrasaban a 25 mL con agua destilada, se agitaban en Vórtex y se transferían a un recipiente limpio donde se almacenaban a 4°C. Finalmente, el contenido de cationes a partir de estos extractos digeridos se determinaba en el Servicio de Ionómica del CEBAS-CSIC mediante espectrometría de emisión óptica de plasma acoplado inductivamente (ICP-OES) en un equipo ICAP 6500 DUO/IRIS Intrepid II XLD (Thermo Scientific, Waltham, MA, EEUU).

Por otra parte, para determinar el contenido de aniones de las muestras se partía de 0,1 g de material vegetal seco y molido y se disolvía mediante agitación durante 30 min en 12

mL de agua destilada. A continuación, los extractos eran filtrados a través de un filtro de 0,45 µm (Syringe Filters PTFE, Macherey-Nagel CHROMAFIL® Xtra, Alemania), y después analizados en un cromatógrafo de iones Dionex ICS-2100 (Thermo Scientific, Waltham, MA, EEUU). Este análisis también se llevó a cabo en el Servicio de Ionómica del CEBAS-CSIC.

3.9. Tasa de translocación de agua e iones

El transporte neto de Na⁺, Cl⁻ y agua a la parte aérea se calculó en base a las ecuaciones planteadas por Hunt (1978), que son las siguientes:

$$\text{Translocación neta (g soluto} \cdot \text{g}^{-1} \text{ PF raíz} \cdot \text{día}^{-1}) = [(M_2 - M_1) / (t_2 - t_1)] \cdot [(\ln RW_2 - \ln RW_1) / (RW_2 - RW_1)]$$

Donde M₁ y M₂ representan el contenido de Na⁺, Cl⁻ o agua, en cada caso, en toda la parte aérea (hojas y tallos) en los tiempos de muestreo 1 y 2 (t₁ y t₂), y RW₁ y RW₂ representan el peso fresco de la raíz en los tiempos de muestreo 1 y 2.

3.10. Contenido de azúcares y ácidos orgánicos

Para la determinación de azúcares y ácidos orgánicos en muestras de hoja se siguió el protocolo descrito en Sánchez-Bel *et al.* (2012). En primer lugar se obtuvieron extractos crudos a partir unos 8-10 g de material vegetal fresco, el cual se introducía en una punta de pipeta de 5 mL a la que previamente se le había colocado en el extremo una pequeña cantidad de fibra de vidrio que actuaba como filtro para el extracto. A continuación, las puntas se introducían en tubos de 50 mL y se centrifugaban durante 15 minutos a 1.000 g y 4°C. El extracto obtenido se volvía a centrifugar a 14.000 g durante 15 minutos y 4°C, recogiendo el sobrenadante y quedando en el precipitado todas las impurezas, macromoléculas y restos celulares. Una dilución 1:2 de este extracto se filtraba primero con un filtro de 0,45 µm (Syringe Filters PTFE, Macherey-Nagel CHROMAFIL® Xtra, Alemania) y posteriormente con un filtro Spe-ed SPE Octadecyl C18/18% (Mini Spe-ed Cartridge, Macherey-Nagel CHROMABOND® C18ec, Alemania). Posteriormente, en los extractos filtrados se determinaba el contenido de azúcares y ácidos orgánicos mediante el equipo de cromatografía líquida de alta resolución HPLC modelo LC-10Atpv (Shimadzu, 604-8511 Kyoto, Japón). Este equipo contiene 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, EEUU). Las condiciones de trabajo del HPLC se especifican en la Tabla 7. 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 3.000, 2.400, 1.200, 600, 300 y 150 ppm para cada metabolito analizado.

Tabla 7. Condiciones de trabajo del HPLC.

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

3.11. Potencial osmótico

El potencial osmótico se determinó por el método crioscópico de depresión del punto de congelación, utilizando un osmómetro Osmometer Automatic (Roebbling, Alemania) a partir de extractos crudos de folíolos de la 1ª hoja desarrollada (obtenidos por centrifugación como se describe en el apartado anterior). El osmómetro crioscópico determina el potencial osmótico de una solución mediante la medición de su punto de congelación. Las soluciones tienen propiedades coligativas que dependen del número de partículas disueltas y no de la naturaleza del soluto. Una de estas propiedades 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 kg de agua tiene un punto de congelación de -1,86°C, en comparación con el agua pura, cuyo punto de congelación es de 0°C (Taiz y Zeiger, 2007). El equipo se calibraba en dos fases, primero con agua destilada (que marca el valor 0), y después con una solución de NaCl de 300 mOsmol. Las medidas se realizan en 100 µL de extracto, y se realizaron tres medidas por cada extracto. La transformación desde las unidades que proporciona el

equipo, mOsmol (mmol de soluto osmóticamente activo · kg⁻¹), a MPa se realizó por la equivalencia tal y como especifica el fabricante:

$$\Psi\pi \text{ (MPa)} = [(-2 \cdot \text{mmol kg}^{-1}) / 1.000] \cdot \text{factor de dilución}$$

El potencial osmótico relativo se calculó como el cociente entre el potencial osmótico ($\Psi\pi$) y el contenido de agua. La contribución relativa de los solutos inorgánicos y orgánicos al potencial osmótico de la hoja se obtuvo mediante la ecuación de van't Hoff ($\Psi\pi = cRT$), donde 'c' es la concentración molar de cada soluto, y 'RT' es un valor constante (0,002479 m³ MPa mol⁻¹ para 25°C).

4. Análisis de microscopía

4.1. Determinación de la densidad y apertura estomática

El número de estomas (densidad estomática) así como el grado de apertura de los mismos se determinó mediante dos métodos alternativos:

Microscopía óptica

En este caso, la densidad y apertura estomática se determinaban sobre una sección de tejido epidérmico de la superficie adaxial y abaxial de la 1ª hoja completamente desarrollada despojada de la misma mediante unas pintas cortas de punta fina, siguiendo el procedimiento descrito por Driscoll *et al.* (2006). Las secciones epidérmicas se introducían en tampón fosfato citrato (citrato de sodio 0,1 M, fosfato de sodio 0,1 M, pH 6,5), y después se montaban sobre un portaobjetos con tapa de vidrio para ser examinadas bajo un microscopio óptico Olympus BX40 (Olympus Corporation, Tokyo, Japón). A continuación, se obtenían imágenes digitales utilizando el software de análisis fotográfico Sigma ScanPro, versión 5 (Sigma Chemical Co, St Louis, MO, EEUU).

Microscopía electrónica de barrido (SEM)

En este caso, se obtuvieron secciones de unos 0,5 cm de diámetro de folíolos de la 1ª hoja completamente desarrollada mediante una cuchilla afilada, las cuales se fijaron durante 3h en una solución de glutaraldehído al 2,5% y paraformaldehído al 4% en tampón fosfato sódico 0,1 M (pH 7,2), tras lo cual se lavaron durante toda la noche en tampón fosfato sódico 0,1 M más sacarosa isosmolar (pH 7,2). Después, fueron

incubadas durante 2h en una solución de tetróxido de osmio al 1% en tampón fosfato sódico 0,1 M (pH 7,2), y se lavaron nuevamente en el tampón fosfato sódico 0,1 M más sacarosa isosmolar (pH 7,2) durante toda la noche. A continuación, las muestras se deshidrataron progresivamente en disoluciones seriadas de acetona de concentración creciente (30%, 50%, 70%, 90% y 100%), permaneciendo 10 min en cada disolución. Después, las muestras se desecaron al punto crítico con acetona al 100% y CO₂ líquido, y se colocaron alternativamente exponiendo la superficie adaxial o la abaxial sobre discos de cobre. Una vez aseguradas en la superficie de los discos mediante cemento conductor, las muestras se recubrieron con oro con el metalizador Bio-Rad Polaron Division 200, y fueron observadas usando un microscopio electrónico de barrido JSM-6100 (JEOL, Japón), utilizando un voltaje de 15 kV (Olmos y Hellín, 1998). Finalmente, se obtuvieron imágenes digitales de las secciones de la superficie adaxial y abaxial.

Independientemente de la técnica utilizada, el procesamiento de las imágenes y los análisis morfométricos se realizaron usando el programa de análisis digital ImageJ desarrollado por el *National Institutes of Health* (<http://imagej.nih.gov/ij/index.html>). La densidad (estomas · mm⁻²) y apertura de los estomas (µm) se calculó a partir de 15 imágenes seleccionadas al azar de las secciones obtenidas en cada muestra. Además, puesto que la densidad estomática depende no solo del número de estomas sino también del tamaño de las células epidérmicas, se calculó el índice estomático (%), que normaliza el efecto de la variación del tamaño de las células epidérmicas en la densidad estomática, y se obtiene mediante la siguiente relación:

$$\text{Índice estomático (\%)} = [(densidad\ estomática \cdot 100) / (densidad\ estomática + densidad\ de\ las\ células\ epidérmicas)]$$

4.2. Determinación de las características anatómicas del mesófilo foliar y la ultraestructura celular

Para estos análisis microscópicos, se obtuvieron utilizando una cuchilla afilada secciones de 1 mm² de folíolos de la 1ª hoja completamente desarrollada de cada planta. Estas secciones fueron fijadas durante 2,5h a 4°C en una solución de glutaraldehído al 2,5% y paraformaldehído al 4% en tampón fosfato sódico 0,1 M (pH 7,2). A continuación, las muestras fueron lavadas tres veces durante 15 minutos en tampón

fosfato sódico 0,1 M más sacarosa isosmolar y post-fijadas durante 2h en una solución de tetróxido de osmio al 1% en tampón fosfato sódico 0,1 M (pH 7,2). Después, se realizaron otros tres lavados con tampón fosfato 0,1 M más sacarosa isosmolar, dos de ellos durante 15 min y el último durante toda la noche. Las muestras fijadas se deshidrataron progresivamente en disoluciones seriadas de etanol de concentración creciente (35%, 50%, 70%, 96% y 100%), permaneciendo 20 min en cada una de ellas. Tras la deshidratación, las muestras se incluyeron en resina Spurr (Spurr, 1969), para lo cual se sometieron a dos incubaciones en óxido de propileno de 30 min cada una, seguidas de una incubación en una mezcla de óxido de propileno – resina Spurr (1:1) durante 1,5h, y finalmente en resina Spurr durante 24h a 4°C. A continuación, las muestras se colocaron en moldes pre-tallados y rellenos con la misma resina, y se solidificaron en una estufa a 68°C durante 24h. A partir de los bloques polimerizados se obtuvieron secciones semifinas (0,5 – 0,7 μm de grosor) con un ultramicrotomo Leica EM UC6 (Leica Mikrosysteme, Viena, Austria). Estos cortes se montaron en un portaobjetos y se tiñeron con azul de toluidina 1% (p/v) durante 5 min a 60°C, y después se lavaron con agua desionizada. Finalmente, las muestras teñidas se observaron en un microscopio Olympus BX40 en campo claro (Olympus Corporation, Tokio, Japón) y se obtuvieron imágenes digitales. En las secciones semifinas se determinaron el grosor foliar (μm), el tamaño de las células del parénquima en empalizada y esponjoso (μm^2) y la densidad celular (células \cdot mm⁻²).

Por otro lado, para el estudio de la ultraestructura celular, se obtuvieron secciones ultrafinas (de 70 – 90 nm de grosor) a partir de los bloques polimerizados. A continuación, estas secciones se recogieron en rejillas de cobre y se contrastaron mediante tinción con acetato de uranilo y después con citrato de plomo. Una vez contrastadas las muestras, se observaron en el microscopio electrónico de transmisión Philips Tecnai 12 (Philips, Eindhoven, Holanda), equipado con una cámara CCD SIS MegaView III (1280 \times 1280 pixel, 12 bit), con la que se obtuvieron imágenes digitales.

En todos los análisis, el procesamiento de las imágenes se realizó mediante el programa de análisis digital ImageJ, y los parámetros morfométricos se calcularon a partir de 18 imágenes seleccionadas al azar de las secciones semifinas o ultrafinas obtenidas de cada muestra.

Finalmente, señalar que el procesamiento de las muestras para microscopía electrónica de barrido y transmisión, así como la utilización de los microscopios, se llevó a cabo en la Sección de Microscopía del Servicio de Apoyo a la Investigación de la Universidad de Murcia.

5. Análisis de expresión génica mediante PCR

5.1. Extracción de RNA

Para la extracción del RNA total se utilizaba material vegetal congelado en nitrógeno líquido inmediatamente tras el muestreo y conservado a -80°C hasta el momento de la extracción. El material vegetal se trituraba con nitrógeno líquido en un mortero hasta la obtención de un fino polvo homogéneo. La extracción de RNA se llevaba a cabo con el kit comercial RNeasy Plant Mini (Qiagen, Hilden, Alemania) siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante, que se detalla a continuación. En primer lugar, a 100 mg de material vegetal homogeneizado se le añadían 450 μL de tampón de lisis RLT, el cual contiene tiocianato de guanidina, cuya función es provocar la lisis celular y la desnaturalización de proteínas, causando así la inhibición de RNAsas y DNAsas del extracto. Al buffer RLT se le acondicionaba previamente β -mercaptoetanol (10 μL por 1 mL de tampón RLT) que favorece la inactivación eficaz de las RNAsas del lisado. Después, el lisado se transfería 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 le añadían 0,5 volúmenes de etanol para clarificar y promover la unión selectiva del RNA a la membrana de sílice de la segunda columna del kit RNeasy. Una vez unido el RNA a esta segunda columna, se realizaba un primer lavado con 350 μL del tampón RW1, que contiene sales de guanidina y etanol, cuya función es 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 DNasa (RNase-Free DNase Set, Qiagen), con el objetivo de degradar el DNA genómico que pudiera haberse unido a la membrana. Posteriormente, la membrana se lavaba primero con 350 μL de tampón RW1 y dos veces sucesivas con 500 μL de tampón RPE. El tampón RPE contiene etanol y su principal función es eliminar cualquier traza de sal de la membrana proveniente de los

tampones utilizados. Una vez purificado el RNA, se procedía a la elución del mismo con 30 μ L de agua pura libre de RNasa y DNasa (Qiagen), conservando la elución a -80°C hasta su posterior análisis. La cantidad y calidad del RNA extraído se estimó siguiendo los protocolos descritos a continuación.

5.2. Determinación del grado de integridad y pureza del RNA extraído

La concentración y la pureza del RNA extraído se analizaban por espectrofotometría utilizando un espectrofotómetro NanoDrop ND-2000 (ThermoScientific, Waltham, MA, EEUU) tomando los valores de absorbancia (Abs) a las longitudes de onda de 280 nm y 260 nm. Las relaciones Abs_{260}/Abs_{280} y Abs_{260}/Abs_{230} se usaban para estimar la contaminación del extracto de RNA por proteínas y fenoles (Abs_{260}/Abs_{280}) y por polisacáridos (Abs_{260}/Abs_{230}). Generalmente, se consideraba que una extracción de RNA era de alta pureza cuando el valor de la relación 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.

La ausencia de degradación y de contaminación por DNA genómico de las muestras de RNA 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 RNA mezclado con 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 se sumergía durante 15 min en un baño de bromuro de etidio (43 μ M) en tampón TAE 1x (40 mM Tris, 20 mM acetato, 1 mM EDTA, pH 8,5). Finalmente, las bandas de RNA del gel se visualizaban bajo luz ultravioleta (UV) en un analizador de geles y fluorescencia G:BOX (Syngene, Bangalore, India).

5.3. Síntesis de cDNA

La síntesis de cDNA se realizaba a partir del RNA extraído una vez había superado los criterios de calidad anteriores, utilizando el kit comercial iScriptTM Reverse Transcription Super Mix para RT-qPCR (BioRad, Hercules, CA, EEUU) el cual contiene en un solo mix todos los componentes, excepto el RNA, necesarios para la síntesis de la primera hebra de cDNA: transcriptasa inversa del virus de la leucemia

Materiales y métodos

murina Moloney (Moloney Murine Leukemia Virus Retro Transcriptase; M-MLV-RT), inhibidor de RNasa, dNTPs, oligo (dT), cebadores aleatorios, tampón, MgCl₂ 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 cDNA se muestra en la Tabla 8.

Tabla 8. Mezcla de reacción final para una reacción simple de síntesis de cDNA.

Componentes	Volumen de reacción (µL)
5x iScript Supermix	4
RNA (200 ng/µL)	5 (1 µg de RNA)
Agua libre de nucleasas	11
Volumen total	20

La mezcla de reacción se incubaba en un termociclador Corbett Research PCR Palm Cycler (Qiagen) siguiendo las condiciones descritas en la Tabla 9.

Tabla 9. Condiciones programadas en el termociclador para la síntesis de cDNA.

Etapas	Temperatura (°C)	Tiempo (min)
Hibridación de cebadores	25	5
Transcripción inversa	42	30
Inactivación de la RT	85	5
Mantenimiento	4	∞

5.4. PCR cuantitativa a tiempo real (RT-qPCR).

Una vez obtenido el cDNA, el nivel de expresión relativa de los genes de interés 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 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 DNA utilizando una sonda fluorescente. Mediante la detección de fluorescencia se puede medir, durante la amplificación, la cantidad de DNA sintetizado en cada momento, ya que la emisión de fluorescencia producida en la reacción es proporcional a la cantidad de DNA sintetizado, 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 DNA bicatenario más usado en RT-qPCR es el SYBR Green PCR (Qiagen), y es el que hemos utilizado en esta tesis. La RT-qPCR se realizaba en un RotorGen 3000 (Qiagen). La mezcla de reacción final, descrita en la Tabla 10, se llevaba a cabo en un volumen final de 25 μL .

Tabla 10. Mezcla de reacción final para la RT-qPCR.

Componentes	Volumen de reacción (μL)	Concentración
MasterMix 2x *	11,5	1X
Cebador Sentido (20 μM)	2	0,47 μM
Cebador Anti-sentido (20 μM)	2	0,47 μM
cDNA	1	1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$
Agua libre de nucleasas	8,5	-
Volumen total	25	-

*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 como normalizador ($\Delta\text{Ct} = \text{Ct gen interés} - \text{Ct gen normalizador}$) en cada muestra, y posteriormente se comparan los ΔCt 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:

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

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 cDNA inicial. Los resultados se expresaron en unidades arbitrarias por comparación con la muestra de referencia en cada caso (generalmente WT en ausencia de sal) a cuyo nivel de expresión se le asignaba el valor de 1. Todas las reacciones se realizaron por triplicado y para cada ensayo de PCR se obtuvieron las curvas de fusión (*melting*) de los productos amplificados con el fin de identificar posibles amplificaciones inespecíficas. El protocolo de amplificación utilizado es el que se describe en la Tabla 11:

Materiales y métodos

Como gen normalizador se utilizaba el factor de elongación 1 alfa (*SIEF1a*, accesoión de GenBank AB061263), cuya expresión es constitutiva en tomate y no se ve modificada por los tratamientos de estrés aplicados a las plantas. Los cebadores se diseñaban a partir de las secuencias disponibles para tomate en Sol Genomics Network (<https://solgenomics.net/>).

Tabla 11. Programa utilizado en el termociclador para la reacción de PCR cuantitativa.

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

Todos los cebadores utilizados fueron sintetizados y purificados por filtración en gel por la compañía Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, EEUU), y se calculó la eficiencia de cada pareja mediante el método de diluciones seriadas de las muestras de cDNA para obtener el valor de la pendiente de la recta que resulta de representar Ct/Log Input (Eficiencia = $10^{-1/\text{slope}} - 1$).

6. Tratamiento estadístico

Los datos fueron sometidos a un análisis de varianza (ANOVA) siguiendo los métodos estandarizados que ofrece el programa SPSS 21.0. 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. En el caso de haberlas, se aplicó el test LSD (diferencia mínima significativa) considerando un nivel de confianza del 5% ($P < 0,05$) para identificar dichas diferencias entre varias medias. Para estudiar la existencia de diferencias significativas entre pares de medias, se aplicó el test *t* de Student considerando también un intervalo de confianza del 5% ($P < 0,05$).

CAPÍTULO I

IV. CAPÍTULO I

RESPUESTA FENOTÍPICA, FISIOLÓGICA Y MOLECULAR DE LA ESPECIE SILVESTRE *SOLANUM PENNELLII* A LOS ESTRESSES HÍDRICO Y SALINO

1. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

A pesar de los esfuerzos realizados por los mejoradores para desarrollar cultivos más tolerantes a salinidad y sequía, el desarrollo de los programas de mejora genética ha sido lento y se ha visto dificultado por la complejidad y la naturaleza multigénica de los caracteres de tolerancia (Hill *et al.*, 2013; Deinlein, 2014; Langridge y Reynolds, 2015). Por ello, es necesario un abordaje multidisciplinar en el que se combinen el poder descriptivo de los análisis fisiológicos con métodos de biología molecular que permitan identificar y caracterizar la función de genes clave implicados en la tolerancia a estos estreses. Una gran limitación del éxito de los programas de mejora genética dirigidos al desarrollo de variedades más tolerantes a estreses abióticos ha sido la escasa variación genética de estos caracteres en las especies cultivadas (Hill *et al.*, 2013; Langridge y Reynolds, 2015).

En tomate, a pesar de la existencia de una gran diversidad genética para la tolerancia a estreses abióticos en las especies silvestres, los mecanismos que regulan la respuesta a sequía y salinidad aún están en vías de caracterización, y solo se han identificado unos pocos genes con función relevante en la tolerancia a estos estreses (Iovieno *et al.*, 2016; Campos *et al.* 2016; Arms *et al.*, 2017; Egea *et al.*, 2018a). Entre estas especies silvestres se encuentra *Solanum pennellii*, que es endémica de las regiones andinas de Sudamérica y presenta una elevada tolerancia a sequía y salinidad (Bolarín *et al.*, 1991; Santa-Cruz *et al.*, 1999). Además, la secuenciación del genoma de *S. pennellii* se publicó recientemente y resulta de gran utilidad para la identificación de genes candidatos de tolerancia a estrés (Bolger *et al.*, 2014). Por todo ello, *S. pennellii* constituye un buen modelo experimental para avanzar en el conocimiento de los

mecanismos que determinan la adaptación al estrés en tomate, así como una fuente de variabilidad genética valiosa para los programas de mejora dirigidos a aumentar la tolerancia a sequía y salinidad (Atarés *et al.*, 2011). Los escasos avances logrados hasta ahora pueden ser, en parte, debidos al modo de aplicar el estrés así como al periodo de exposición. Por ejemplo, una exposición severa al estrés por un periodo muy corto de tiempo puede llevar a la identificación de genes y mecanismos relacionados con la supervivencia a condiciones extremas y no con los procesos implicados en la tolerancia a medio o largo plazo (Shavrukov, 2013; Hancock *et al.*, 2014). En este sentido, Claeys e Inzé (2013) señalaron que la exposición a un estrés hídrico moderado podía favorecer el mantenimiento del balance desarrollo-tolerancia en condiciones de sequía, un escenario más fiel a la realidad desde un punto de vista agronómico pero menos estudiado (Des Marais *et al.*, 2012; Clauw *et al.*, 2015).

Por tanto, en este capítulo de la tesis se ha evaluado, en primer lugar, la respuesta fisiológica y molecular de *S. lycopersicum* y *S. pennellii* a un nivel moderado de estrés hídrico, con el fin de identificar determinantes clave de la tolerancia de *S. pennellii* frente a dicho estrés (apartado 4.1). Además, esta estrategia puede ser útil para identificar genes implicados en la fase osmótica, común a sequía y salinidad, evitando la interferencia de la componente iónica provocada por la salinidad.

En el segundo apartado (4.2), se ha llevado a cabo un abordaje multidisciplinar para analizar la respuesta anatómica, fisiológica y molecular de tomate cultivado y *S. pennellii* a la salinidad, con el objetivo de identificar mecanismos clave y genes implicados en la tolerancia de la especie silvestre frente a dicho estrés.

Finalmente, en el tercer apartado (4.3), se ha avanzado en la caracterización del mutante *pennellii salt hypersensitive (psh)*, identificado previamente en el escrutinio de la colección de mutantes de *S. pennellii* generada dentro de nuestro proyecto coordinado (Atarés *et al.*, 2011). Este mutante mostraba un fenotipo muy interesante, puesto que presentaba una elevada clorosis foliar e hipersensibilidad a la salinidad desde los primeros días de la aplicación del estrés, si bien el mutante era indistinguible de WT en condiciones de crecimiento óptimas (Plasencia-Martínez, 2015). En la caracterización de *psh* previa a esta tesis doctoral, se comprobó mediante un análisis genético que la mutación responsable del fenotipo hipersensible es monogénica y recesiva; sin embargo, el gen alterado no está etiquetado por el inserto T-DNA. Dado el

interés de este mutante, profundizar en su caracterización continúa siendo un objetivo prioritario, además de abordar la identificación del gen mutado mediante estrategias alternativas. El estudio de mutantes como *psh* es de gran importancia para elucidar los mecanismos que regulan la tolerancia a salinidad en *S. pennellii*.

2. METODOLOGÍA

2.1. Diseño experimental de los ensayos de estrés hídrico

Los ensayos de estrés hídrico en *S. lycopersicum* y *S. pennellii* se llevaron a cabo en la cámara de cultivo de condiciones controladas, con los parámetros ambientales descritos en la Tabla 4 (apartado 2 de la sección de Materiales y Métodos). Se realizaron tres ensayos de estrés hídrico, siguiendo dos procedimientos experimentales: en el primer experimento, las plantas de cada especie se cultivaron de forma independiente en macetas de 1,5 L de capacidad, mientras que en el segundo y el tercer experimento, se emplearon macetas de 3 L de capacidad en las que se colocaron conjuntamente dos plantas, una de cada especie. En todos los ensayos, las plantas no sometidas a estrés (control) se regaban diariamente con disolución Hoagland diluida al 50% hasta saturar la capacidad del sustrato. La aplicación del estrés hídrico se llevó a cabo cuando las plantas alcanzaron un estado de desarrollo de 4-5 hojas completamente desarrolladas, y consistió en la interrupción del riego, de forma que la intensidad del estrés se incrementó gradualmente a medida que avanzaba el ciclo de deshidratación. Con el fin de minimizar la evaporación de la solución en el sustrato, se cubrió la superficie de las macetas con plástico 'Parafilm', rodeando el tallo principal de las plantas.

En cada experimento se incluyeron nueve plantas de cada especie por cada tratamiento (control y estrés hídrico), las cuales fueron agrupadas en tres réplicas biológicas de tres plantas cada una. Los análisis destructivos se realizaron en la 1ª y la 2ª hoja completamente desarrollada de cada planta, de las que se separaron los folíolos y se agruparon por réplicas biológicas. La mitad de los folíolos se empleó para los análisis fisiológicos, y la otra mitad se congeló inmediatamente en nitrógeno líquido y se guardó a -80°C para los análisis moleculares posteriores.

2.2. Diseño experimental de los ensayos de estrés salino

2.2.1. Estudio comparativo de tomate y *S. pennellii* en estrés salino

El estudio comparativo en estrés salino entre *S. lycopersicum* y *S. pennellii* se llevó a cabo en las cámaras de cultivo en condiciones ambientales controladas (ver apartado 2 de la sección de Materiales y Métodos). Tras la germinación en las condiciones previamente descritas, y cuando las plantas alcanzaron el estado de desarrollo de 1-2 hojas completamente desarrolladas, se transfirieron al sistema hidropónico (apartado 2.2 de la sección de Materiales y Métodos). Un total de 30 plantas de cada especie se distribuyeron de forma aleatoria en tres cubetas de cultivo hidropónico llenas de disolución Hoagland al 50% (cada cubeta contenía 10 plantas de cada especie). El tratamiento salino se aplicó cuando las plantas alcanzaron un estado de desarrollo de 4-5 hojas completamente desarrolladas, y consistió en disolución Hoagland al 50% más una concentración de 100 mM NaCl durante dos semanas. Se realizaron muestreos en control (día 0) y tras 1, 2, 7 y 14 días de tratamiento salino, y en cada muestreo se incluyeron 6 plantas de cada especie (dos plantas de cada especie por cubeta). Para los análisis destructivos, se separaron en cada planta los folíolos de la 1ª y 2ª hoja desarrollada y la raíz, y la mitad del material se empleó para los análisis fisiológicos, y la otra mitad se congeló inmediatamente en nitrógeno líquido y se guardó a -80°C para los análisis moleculares posteriores. Se realizaron dos experimentos independientes en las mismas condiciones.

2.2.2. Caracterización del mutante *pennellii salt hypersensitive (psh)*

La absorción de agua y solutos a través de la raíz se produce de manera considerablemente más rápida en el sistema hidropónico comparado con el cultivo en sustrato, y por tanto, también los síntomas de afectación por el estrés salino se muestran antes. Dada la hipersensibilidad del mutante de *psh* de *S. pennellii* al estrés salino, decidimos llevar a cabo su caracterización en sustrato para que la aplicación del estrés fuese más gradual y así evitar el colapso de las plantas mutantes. Las plantas del semillero se transfirieron a macetas de 1 L de capacidad con la mezcla de turba negra y perlita en proporción 8:3 previamente humedecida con solución Hoagland al 50%. Una vez las plantas se aclimataron y alcanzaron el estado de 4-5 hojas completamente desarrolladas, se aplicó el tratamiento salino, que consistió en el riego con solución Hoagland al 50% más 100 mM NaCl, aplicado diariamente a cada planta hasta la

saturación del sustrato durante 14 días. Las plantas control se regaron con solución Hoagland al 50% sin sal. Se realizaron muestreos en ausencia de estrés salino (control) y tras 1, 3, 7 y 14 días de tratamiento salino, y en cada uno de ellos se incluyeron nueve plantas por cada genotipo agrupadas en tres réplicas biológicas. Para los análisis destructivos, se separaron en cada planta los distintos tejidos vegetativos (folíolos de la 1ª y 2ª hoja desarrollada, tallo y raíz), y la mitad del material se empleó para los análisis fisiológicos, y la otra mitad se congeló inmediatamente en nitrógeno líquido y se guardó a -80°C para los análisis moleculares posteriores.

La descripción de los análisis fisiológicos llevados a cabo en este trabajo se encuentran detallados en el apartado 3 de la sección de Materiales y Métodos.

2.3. Análisis transcriptómico de tomate y *S. pennellii* en estrés hídrico.

El microarray GeneChip® Tomato Genome (Affymetrix, Santa Clara, CA, EEUU) se utilizó en el análisis transcriptómico comparativo entre las hojas de tomate cultivado y *S. pennellii* en ausencia de estrés y en condiciones de sequía. La hibridación se llevó a cabo en la empresa inBIONova Biotech S.L., situada en el campus de la Universidad de Murcia. Se hibridaron un total de 12 chips, siendo cada uno de ellos una réplica biológica formada por RNA de folíolos de la 1ª hoja desarrollada procedente de tres plantas agrupadas (en total, tres réplicas biológicas por cada especie y condición experimental). La extracción de RNA se realizó mediante el kit comercial RNeasy Plant Mini (Qiagen, Hilden, Alemania), cuyo protocolo se detalla en el apartado 5.1 de la sección de Materiales y Métodos. La cantidad y calidad del RNA se comprobó en un bioanalizador (Agilent, Santa Clara, CA, EEUU), y espectrofotométricamente en un Nanodrop® ND-2000 (ThermoScientific, Waltham, MA, EEUU). A continuación, se sintetizó cRNA biotilinado a partir de 200 ng de cada muestra mediante el kit comercial GeneChip 3' IVT Express (Affymetrix), siguiendo el protocolo estándar del fabricante, y la cantidad y calidad obtenida se comprobó en Nanodrop y mediante electroforesis en gel de agarosa. Tras esto, se lavó el cRNA y 15 µg fueron fragmentados e incluidos en las mezclas de hibridación, utilizando el kit Hybridization, Wash and Stain (Affymetrix) siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante. Las preparaciones resultantes se hibridaron en el GeneChip® Tomato Genome Array (Affymetrix), el cual ofrece cobertura para 10209 secuencias. Tras el escaneo, los datos del microarray se procesaron mediante los programas Expression Console™ EC 1.1 y BioConductor

affyPLM (Affymetrix) y se comprobó que las 12 muestras superaban los criterios de calidad de marcaje e hibridación. Los valores de intensidad de cada sonda del microarray se procesaron y normalizaron siguiendo el método Robust Multichip Average (RMA), obteniéndose una lista final de 5050 secuencias (lista de trabajo). A continuación, se realizó el Análisis de Componentes Principales no supervisado (PCA) y agrupamiento jerárquico, y se comprobó que las muestras tendían a separarse según el genotipo y la condición experimental. Los genes diferencialmente expresados (GDEs) fueron identificados mediante el test *limma* (Ritchie *et al.*, 2015), corregido con el método de *False Discovery Rate* (FDR) (Benjamini y Hochberg, 1995). Se consideraron GDEs aquellos genes con $FDR \leq 0,05$ y $fold-change (\log_2) \geq 2,0$ al comparar genotipos en la misma condición experimental o distintas condiciones experimentales para un mismo genotipo. La anotación de las sondas se obtuvo en la plataforma de Affymetrix y se compilaron en el programa Partek Genomics Suite (Partek Incorporated, St. Louis, EEUU). Para la categorización funcional de los GDEs se utilizó el programa Mapman (Thimm *et al.*, 2004) con la base de datos Slyc_AFFY_SGN_BUILD2_070709, aplicando la corrección de Benjamini-Hochberg y el test Willcoxon Rank Sum. Los datos del microarray se depositaron en la base de datos de la NCBI Gene Expression Omnibus (GEO) (Edgar *et al.*, 2002) con número de referencia GSE97045.

2.4. Análisis de expresión génica mediante RT-qPCR.

El procedimiento llevado a cabo para el estudio de la expresión génica en tomate y *S. pennellii* mediante RT-qPCR realizado en este trabajo se encuentra detallado en el apartado 5 de la sección de Materiales y Métodos. A continuación se presentan las secuencias de los cebadores utilizados para cada gen de interés (Tabla 12):

Tabla 12. Parejas de cebadores utilizados en los ensayos de RT-qPCR para los análisis de expresión génica en tomate y *S. pennellii*.

Gen	Secuencia del cebador (5'-3')
<i>EF-Tu</i>	Sentido: GCAGCCAAGGTTTAGCGAAG
	Anti-sentido: GTCGACATGACCAATGACCAC
<i>RD19A</i>	Sentido: CCTTCTGACGCCAATAAAGC
	Anti-sentido: CGCATGAACCCTGATTCTTC
<i>EF-1Bβ</i>	Sentido: TTCCAGATGGGTGTGTCAAA
	Anti-sentido: CATAGCGTGCGATAGCATTG
<i>AOS</i>	Sentido: CAGGCTTCGGTGTCTGAGA
	Anti-sentido: GACTTTTTGGGCTGGGAGTT
<i>APX2</i>	Sentido: AGTGTTATCCGACGGTGAGC
	Anti-sentido: TCTCAGCATAATCGGAGCAC
<i>NIR1</i>	Sentido: GTGGGCAAGCAATAATCGAG
	Anti-sentido: CTGTCCAGTGCATCCTCACT
<i>GAD1</i>	Sentido: CGACGTCGATAAGAGATTCAGA
	Anti-sentido: CTTCTTCGGCATGGATTTT
<i>ASN1</i>	Sentido: GAGCTTTCTCGCAGGTTGAA
	Anti-sentido: AGAAGCAGGGTCGATAATTGC
<i>PSY</i>	Sentido: CCCGTCGACTACGAAAAAGA
	Anti-sentido: GTTTCTCATGCAAGGCGTAG
<i>FAB2</i>	Sentido: GGGGATGASTTTCTGGTGAGA
	Anti-sentido: ACACACTAGGCAAGGGAAAAA
<i>MVA1</i>	Sentido: ATCGGAAATGGCTTCTCAACC
	Anti-sentido: CTCCATCATGAGCCTCCAAT
<i>PIP2;1</i>	Sentido: TACTTGCGCCTCTACCCATTGG
	Anti-sentido: AGCACAAAACCTCCTTGCAGGA
<i>TIP2;2</i>	Sentido: CCTACCCATGCTTCCAAGAG
	Anti-sentido: GCTGCTGCTGTAGCAACATTA
<i>SOS1</i>	Sentido: TCGAGTGATGATTCTGGTGG
	Anti-sentido: ATCACAGTGTGGAAAGGCTC
<i>HKT1;1</i>	Sentido: TCTAGCCCAAGAACTCAAAT
	Anti-sentido: CTAATGTTACAACCTCCAAGGAATT
<i>HKT1;2</i>	Sentido: TGAGCTAGGGAATGTAATAAACG
	Anti-sentido: AGAGAGAAACTAACGATGAACC
<i>NIX3</i>	Sentido: CTCAAGAGTCACCACCAAGCA
	Anti-sentido: CCAACCAAAACAAGACCCAACA
<i>NHX4</i>	Sentido: TGGTGGGCAGGTTTGATGAGAG
	Anti-sentido: TGTGGTGGCAGCAGGAGACTTA
<i>EF-1α</i>	Sentido: GACAGGCGTTCAGGTAAGGA
	Anti-sentido: GGGTATTCAGCAAAGGTCTC
<i>SKOR</i>	Sentido: CTATAAGGCTGTTGGCAGCAA
	Anti-sentido: TGCCCTGCTCAACCGAAT

3. RESULTADOS

3.1. Respuesta de la especie silvestre *S. pennellii* al estrés hídrico

3.1.1. Diferencias fisiológicas entre el tomate cultivado y *S. pennellii*

En primer lugar se llevó a cabo un experimento de deshidratación en el que las plantas de tomate cultivado (*Solanum lycopersicum*, *Sl*) y la especie silvestre (*Solanum pennellii*, *Sp*) se cultivaron en recipientes independientes. Tras 8 días sin riego, se observaron síntomas evidentes de deshidratación en *Sl*, incluyendo la pérdida de turgor en el ápice, mientras que las plantas de *Sp* mostraron un aspecto visual similar a las irrigadas con normalidad (control) (Figura 8A). Estas diferencias visuales estaban relacionadas con el menor porcentaje de transpiración determinado en plantas de *Sp* respecto a *Sl* durante el periodo de deshidratación (Figura 8B), de manera que el contenido de agua en la parte aérea de la especie silvestre fue significativamente mayor que en la especie cultivada al final del ciclo de deshidratación ($6,41 \pm 0,49$ y $3,93 \pm 0,06$ mL H₂O g⁻¹ PS en *Sp* y *Sl*, respectivamente).

A continuación, se llevó a cabo un experimento en el que las plantas de *Sp* y *Sl* se cultivaron conjuntamente en una misma maceta, asegurando así que ambas especies estuvieran expuestas a las mismas condiciones de estrés hídrico (Verslues *et al.*, 2006) (Figura 8C). Para comprobar que la tolerancia de *Sp* a la deshidratación se debía a una menor transpiración a través de las hojas, en primer lugar se midió la pérdida de agua en folíolos escindidos en plantas cultivadas en condiciones control (Figura 8D). Los resultados reflejaron una menor pérdida de agua en los folíolos de *Sp* comparados con los de *Sl* tras la primera hora transcurrida desde la escisión, y las diferencias se mantuvieron tras 24 h. La transpiración está directamente relacionada con la temperatura (T^a) de la hoja, de forma que a mayor transpiración tiene lugar un mayor enfriamiento de la hoja (Sirault *et al.*, 2009). En este ensayo se midió la evolución de la T^a de la hoja mediante una técnica no invasiva, la termografía infrarroja (TI), durante los primeros 6 días de deshidratación (Figura 8E). Se detectó un incremento de la T^a foliar en ambas especies entre el 1^{er} y 2^o día de deshidratación, el cual se mantuvo hasta el 3^{er} día. Sin embargo, a partir del 4^o día, se observaron diferencias entre ambos genotipos, de manera que la T^a de la hoja se redujo en *Sl* hasta el 6^o día de deshidratación, mientras que se mantuvo constante en *Sp*. En la Figura 8E se muestran

imágenes representativas de TI obtenidas en el 4º día de deshidratación, que ilustran la mayor T^a de las hojas de *Sp* respecto a las de *Sl*.

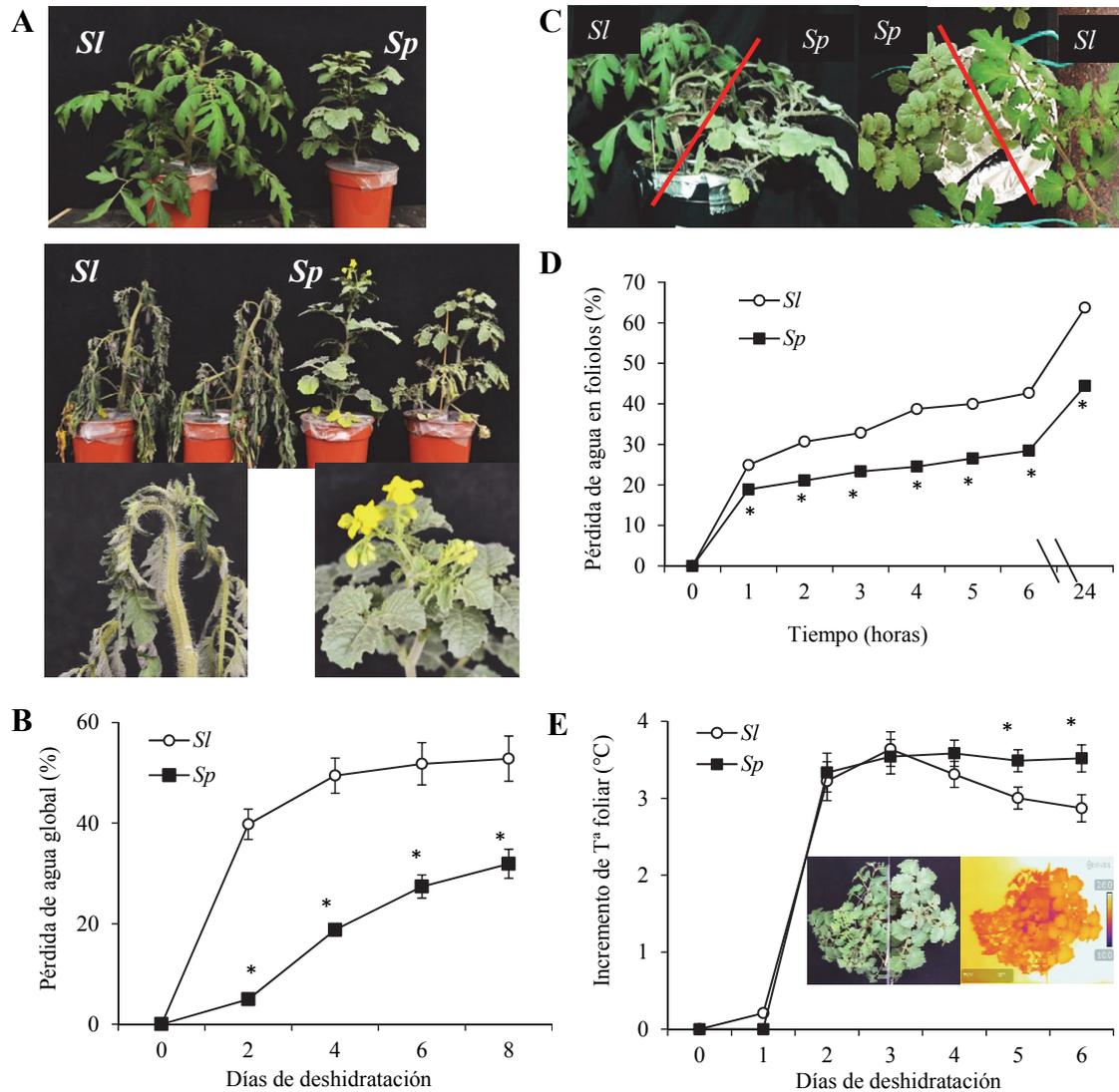


Figura 8. Diferencias en el grado de deshidratación del tomate cultivado (*Sl*) y la especie silvestre *S. pennellii* (*Sp*). **(A)** Imágenes representativas de plantas regadas con normalidad en recipientes individuales (superior) y tras 8 días de deshidratación (inferior). También se incluyen detalles del estado de las hojas apicales en ambas especies al final del ciclo de deshidratación. **(B)** Pérdida de agua global (agua transpirada en la parte aérea) de las plantas dispuestas en macetas individuales a lo largo del ciclo de deshidratación. **(C)** Imágenes de plantas de *Sp* y *Sl* cultivadas conjuntamente en una misma maceta tras 4 días de deshidratación (vista frontal y superior). **(D)** Pérdida de agua relativa al día 0 en folíolos escindidos de plantas de *Sl* y *Sp* dispuestas conjuntamente en la misma maceta y regadas con normalidad. **(E)** Evolución de la temperatura (T^a) foliar determinada por termografía infrarroja en plantas de *Sl* y *Sp* cultivadas en la misma maceta a lo largo del ciclo de deshidratación (se incluyen imágenes digitales y térmicas obtenidas en el 4º día de deshidratación en el área del gráfico). Los datos representan la media \pm error estándar de tres réplicas biológicas ($n=9$), y los asteriscos indican la existencia de diferencias significativas entre las medias de *Sl* y *Sp* para cada tiempo de tratamiento (test t de Student, $P < 0,05$).

Con el fin de caracterizar en mayor profundidad las diferencias existentes entre *Sp* y *Sl* durante periodos moderados de sequía, se llevó a cabo un nuevo experimento con plantas cultivadas en la misma maceta durante 4 días de deshidratación, periodo en el que ninguna de las especies mostraba aún síntomas visuales de estrés (Figura 8C). En las hojas, el contenido de agua relativo y la eficiencia fotoquímica del fotosistema II fueron similares en ambas especies en control, mientras que se obtuvieron valores significativamente superiores en *Sp* en condiciones de estrés hídrico (Figura 9A, B). La tasa fotosintética fue similar en ambas especies ($12,9 \pm 0,8$ y $13,6 \pm 0,6 \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ en control en *Sl* y *Sp*, respectivamente; $13,2 \pm 0,4$ y $12,4 \pm 0,7 \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ tras 4 días de deshidratación en *Sl* y *Sp*, respectivamente). Además, se determinó la peroxidación de lípidos mediante la medida de la producción de malondialdehído (MDA), y se observó que este compuesto aumentaba solamente en las hojas de *Sl* en estrés hídrico (Figura 9C).

En cuanto a los parámetros de intercambio gaseoso g_s y E , solo se observaron diferencias significativas entre ambas especies en estrés hídrico, y en ambos casos los valores fueron menores en *Sp* respecto a *Sl* (Figura 9D, E). g_s es un parámetro principal que determina la tasa de agua transpirada, y está condicionado por la densidad y la apertura estomática. Por ello, adicionalmente se analizó la densidad y apertura estomática en la cara adaxial y abaxial de las hojas de *Sp* y *Sl* (Figura 9F, G). Los resultados revelaron diferencias significativas entre ambas especies solo en la cara abaxial en estrés hídrico, observándose una menor densidad y apertura estomática en *Sp* respecto a *Sl* en condiciones de deshidratación. En conjunto, los resultados de estos ensayos sugieren que la evitación de la pérdida de agua por transpiración a través de las hojas es una estrategia crucial para la tolerancia de la especie silvestre al estrés hídrico.

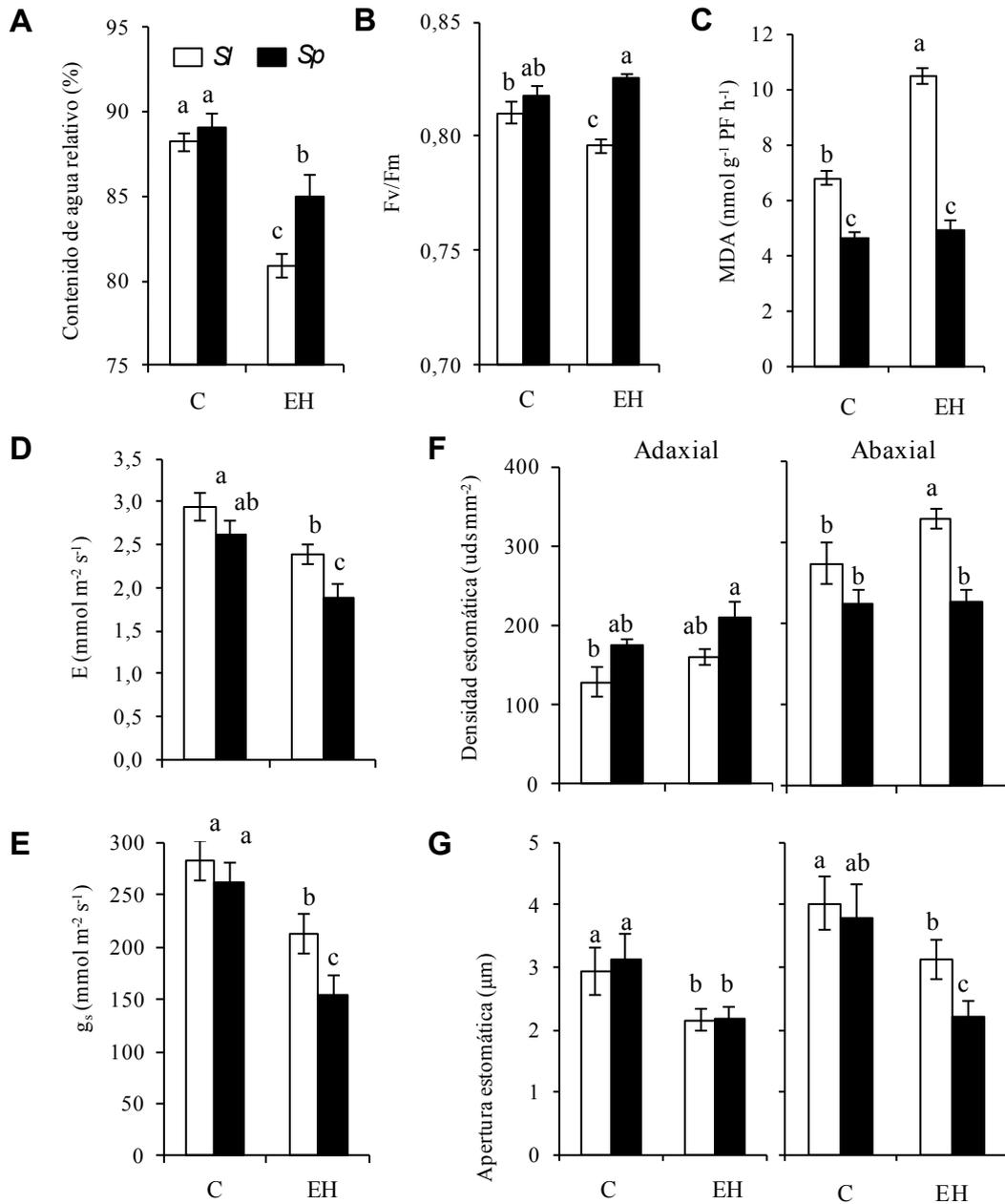


Figura 9. Diferencias fisiológicas y anatómicas inducidas por el estrés hídrico en las hojas de *Sl* y *Sp*. Contenido de agua relativo (**A**), eficiencia fotoquímica del fotosistema II (**B**) y peroxidación lipídica determinada por la producción de MDA (**C**) en hojas de plantas *Sl* y *Sp* dispuestas en una misma maceta, en control (C) y estrés hídrico (EH, 4 días de deshidratación). Tasa de transpiración (E) y conductancia estomática (g_s) en C y EH (**D**, **E**). Densidad estomática y apertura determinadas en la superficie adaxial y abaxial de las hojas de plantas de *Sl* y *Sp*, en C y EH (**F**, **G**). PF = peso fresco. Los datos representan la media \pm error estándar de tres réplicas biológicas (n=9). Los valores con letras diferentes indican diferencias significativas entre medias (LSD, $P < 0,05$).

3.1.2. El análisis transcriptómico comparativo entre hojas de tomate cultivado y *S. pennellii* muestra importantes diferencias de expresión a nivel constitutivo

Para identificar las diferencias a nivel molecular entre especies, se llevó a cabo un análisis transcriptómico en las hojas muestreadas en el último experimento de estrés hídrico, a día 0 (control) y tras 4 días de deshidratación, momento en el que aún no se detectaban los síntomas visuales de estrés hídrico (Figura 8C). Se llevaron a cabo cuatro comparaciones: *Sp* vs *Sl* en control para detectar diferencias de expresión constitutivas entre ambas especies; *Sp* vs *Sl* en estrés hídrico para identificar genes diferencialmente expresados entre ambas especies en condiciones de deshidratación; *Sp* en sequía vs *Sp* en control para identificar transcritos afectados por el estrés en la especie silvestre; por último, *Sl* en sequía vs *Sl* en control para determinar si los cambios detectados en *Sp* en estrés vs control son específicos en la especie silvestre o comunes a ambas especies. El número de genes diferencialmente expresados (GDEs) en *Sp* vs *Sl* con valores de *fold-change* comprendidos entre 2,0 y 3,0 excedieron notablemente a aquellos con *fold-change* mayor, y el número de GDEs inhibidos fue más del doble que los sobreexpresados, tanto en control como en sequía (Figura 10A). Además, el número de GDEs entre *Sp* y *Sl* exclusivamente en sequía fueron aproximadamente el doble que los detectados exclusivamente en control, como queda reflejado en el diagrama de Venn (Figura 10B).

Para validar los resultados del microarray, se analizaron por RT-qPCR 11 GDEs con distinto patrón de expresión entre *Sp* y *Sl* en control y sequía (Figura 11A). Los resultados obtenidos por RT-qPCR mostraron la misma tendencia que los del microarray, con un coeficiente de correlación de Pearson de 0,8894 (Figura 11B), lo que confirmó la validez del análisis transcriptómico. Cada conjunto de GDEs identificado en el diagrama de Venn fue clasificado funcionalmente mediante el programa Mapman (Thimm *et al.*, 2004). La información de los GDEs presentados en las siguientes secciones se encuentra resumida en el Anexo I. La descripción detallada del análisis microarray, así como las listas completas de los GDEs obtenidos en todas las comparaciones pueden consultarse en Egea *et al.* (2018b).

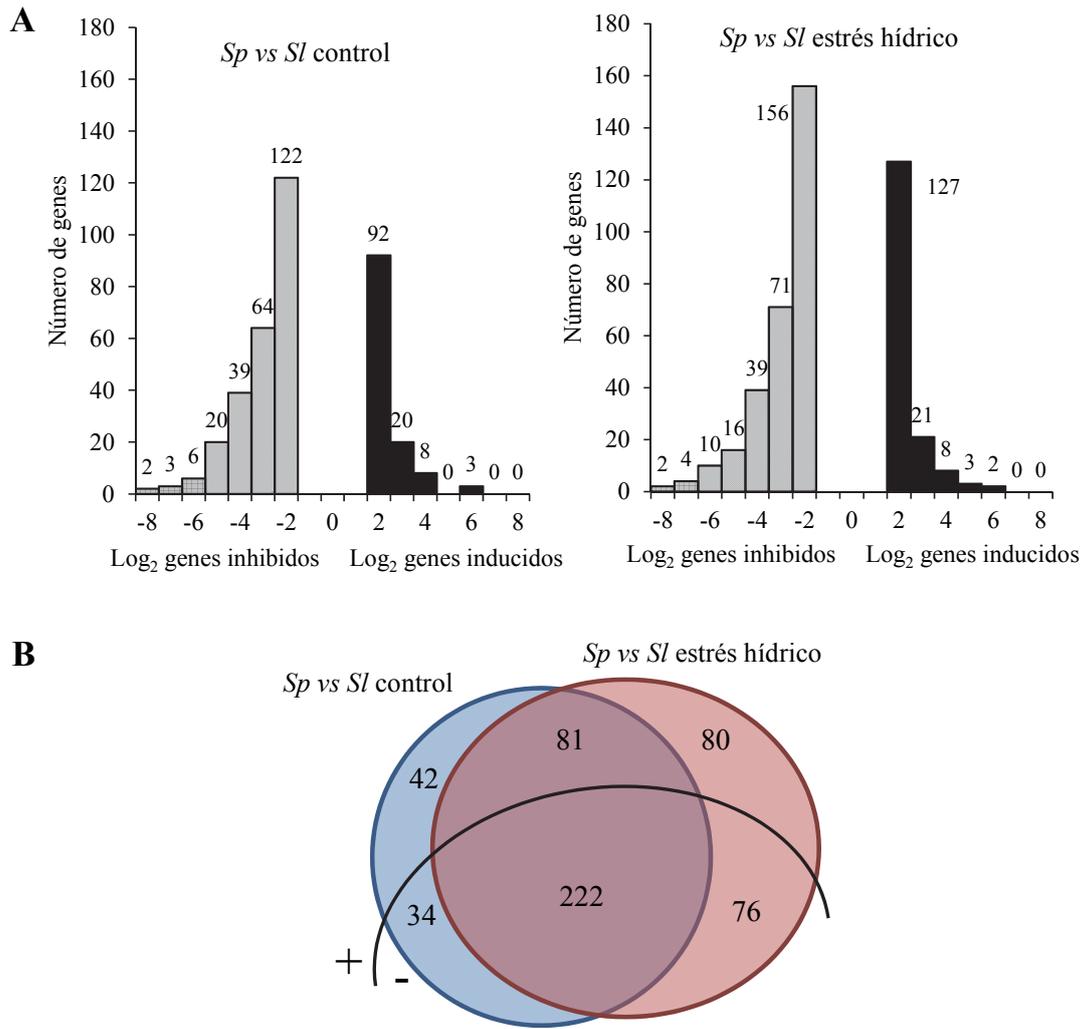


Figura 10. Resumen del análisis transcriptómico comparativo entre las hojas de *S. pennellii* (*Sp*) y tomate cultivado (*Sl*). **(A)** Distribución de genes inducidos (negro) e inhibidos (gris) en *Sp* respecto a *Sl* en control y estrés hídrico (4 días de deshidratación) en función de su valor de fold-change (Log_2). **(B)** Diagrama de Venn en el que se representa el número de genes diferencialmente expresados entre *Sp* y *Sl* en control y estrés hídrico, tanto exclusivamente como los comunes a ambas condiciones, diferenciando entre los inducidos (+) y los reprimidos (-). Se consideraron genes diferencialmente expresados (GDEs) aquellos con $\text{FDR} < 0,05$ y valor absoluto mínimo de fold-change = 2,0.

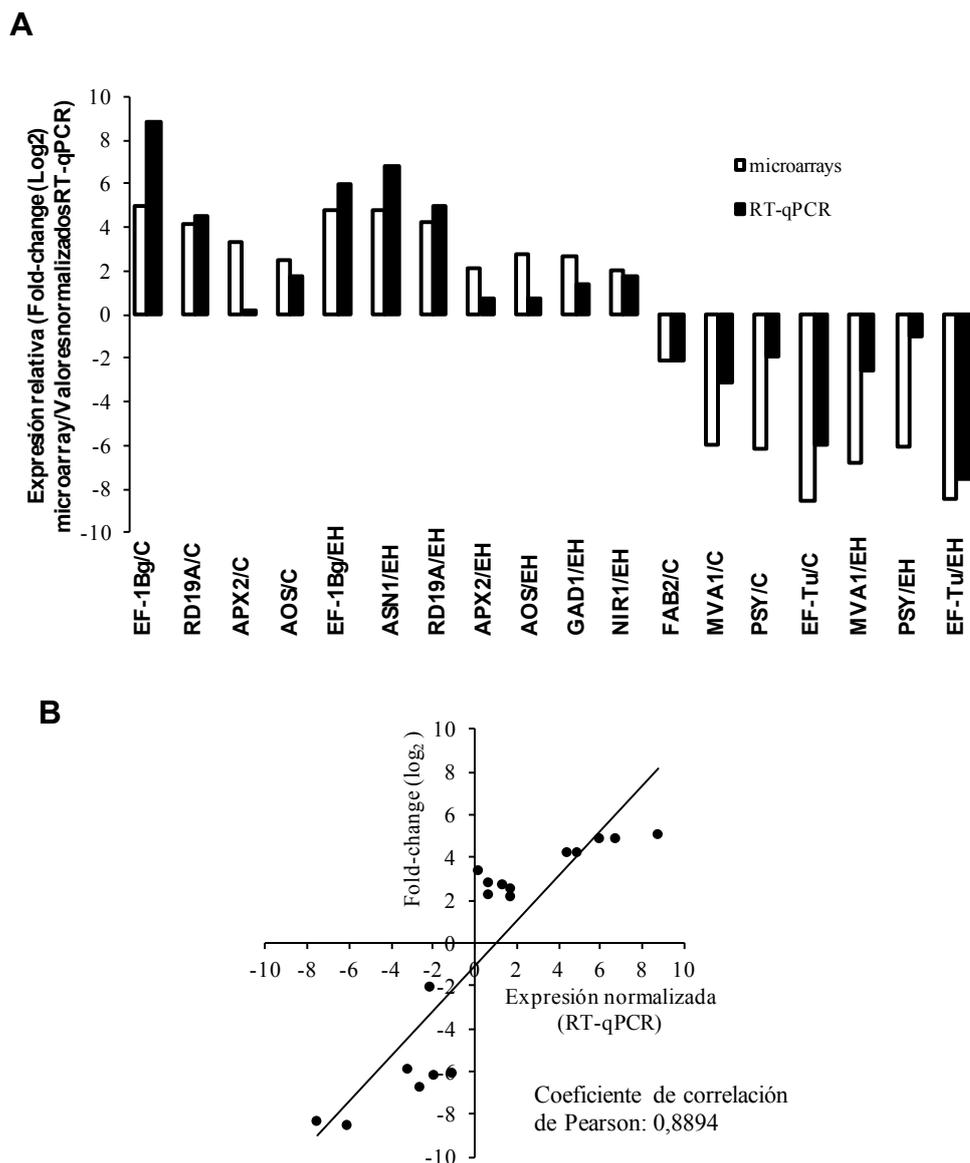


Figura 11. Validación del microarray mediante análisis por RT-qPCR de 11 genes seleccionados en control (C) y estrés hídrico (EH). **(A)** Comparación de los valores de expresión relativa (*S. pennellii* vs *S. lycopersicum*) obtenidos en cada condición experimental en el microarray (Log_2 fold-change) con los obtenidos por RT-qPCR mediante el método $\Delta\Delta\text{Ct}$. Como muestra de referencia se utilizó RNA de folíolos de plantas cultivadas en condición control. **(B)** Análisis de correlación entre los datos del microarray (eje y) y los de RT-qPCR (eje x), mostrando el coeficiente de correlación de Pearson obtenido.

Entre los GDEs constitutivamente inhibidos en *Sp* respecto a *Sl* encontramos genes relacionados con la producción de acetil-CoA y también con la síntesis de ácidos grasos e isoprenoides, los cuales mostraron valores de inhibición similares en condiciones de sequía (Figura 12). Entre ellos, cabe destacar el gen *fitoeno sintasa (PSY)*, implicado en la síntesis de carotenoides, situado aguas arriba de la ruta de síntesis de ABA. Además, el gen *abscísico aldehído oxidasa 3 (AAO3)* implicado en la etapa final de la síntesis de ABA, y el gen *ABA3*, necesario para la funcionalidad de AAO, también estaban inhibidos en *Sp* respecto a *Sl* tanto en control como en estrés hídrico (Figura 12). Otros genes que mostraron valores de inhibición similares en *Sp* respecto a *Sl* en control y sequía fueron *mioinositol-1-fosfato sintasa 3 (MIPS3)* y el transportador de *mio*-inositol *INT1*, implicados en la biosíntesis y el transporte de mioinositol, respectivamente.

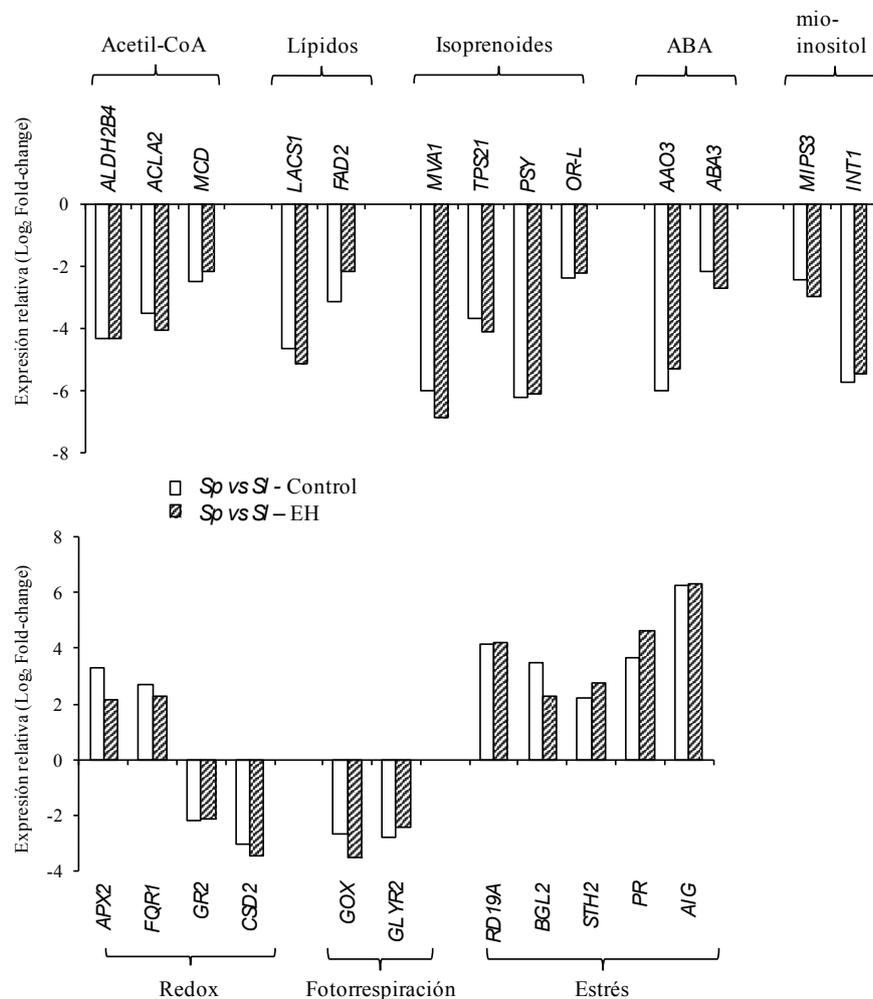


Figura 12. Diferencias de expresión constitutivas entre *S. pennellii* (*Sp*) y *S. lycopersicum* (*Sl*) obtenidas en el análisis microarray. Los genes identificados están relacionados con diferentes procesos metabólicos y fisiológicos. Las plantas de *Sp* y *Sl* se cultivaron en control (riego normal) y estrés hídrico (EH, 4 días de deshidratación por interrupción de riego).

Por otra parte, se detectaron diferencias de expresión en genes implicados en la homeostasis redox (Figura 12). Así, los genes que codifican para una proteína similar a flavodoxina quinona reductasa (*FQR1*) y una ascorbato peroxidasa citosólica (*APX2*) estaban sobreexpresados en *Sp* respecto a *Sl* tanto en control como en sequía, mientras que los genes que codifican isoformas cloroplastidiales de glutatión reductasa (*GR*) y Cu/Zn superóxido dismutasa (*SOD*) mostraron una tendencia opuesta. Una fuente de ROS es la actividad de la glicolato oxidasa (*GOX*) que tiene lugar en los peroxisomas durante la fotorrespiración (Miller *et al.*, 2010), y dos genes implicados en este proceso, *glicolato oxidasa (GOX)* y *glioxilato reductasa 2 (GLYR2)*, estaban inhibidos en *Sp* respecto a *Sl* en control y sequía (Figura 12).

Además, se detectaron algunos genes de respuesta a estrés constitutivamente sobreexpresados en la especie silvestre respecto a la cultivada, y la mayoría de estas diferencias se mantuvieron en condiciones de sequía (Figura 12). Uno de ellos fue el gen de respuesta a la deshidratación *RD19A*, cuyo patrón de expresión génica fue confirmado por RT-qPCR (Figura 11). También genes que codifican proteínas relacionadas con la patogénesis (PR), entre ellos los genes *BGL2* y *STH2*, y el gen *AIG* que codifica una proteína de avirulencia y está relacionado con la respuesta a estrés biótico.

Finalmente, es interesante señalar las notables diferencias de expresión entre *Sp* y *Sl* en dos genes que codifican factores de elongación: *EF-Tu*, inhibido en *Sp* respecto a *Sl* (*fold-change* de -8,53 y -8,41 en control y sequía, respectivamente) y *EF-1Bg*, sobreexpresado en *Sp* respecto a *Sl* (4,97 y 4,82 en control y sequía, respectivamente). Las diferencias de expresión de estos genes se confirmaron mediante RT-qPCR (Figura 11).

3.1.3. Genes inducidos por la sequía en *S. pennellii*.

Genes del metabolismo del carbono y nitrógeno

En primer lugar, se detectaron GDEs entre *Sp* y *Sl* en estrés hídrico relacionados con el metabolismo del carbono (Figura 13). Entre ellos, el gen *FINS1* que codifica una fructosa-1,6-bifosfatasa, estaba sobreexpresado específicamente en *Sp* respecto a *Sl* en sequía, mientras que el gen *ADG1*, implicado en la síntesis de almidón, estaba inhibido

en *Sp*, lo que sugiere que la especie silvestre reduce la movilización de carbono hacia la síntesis de almidón.

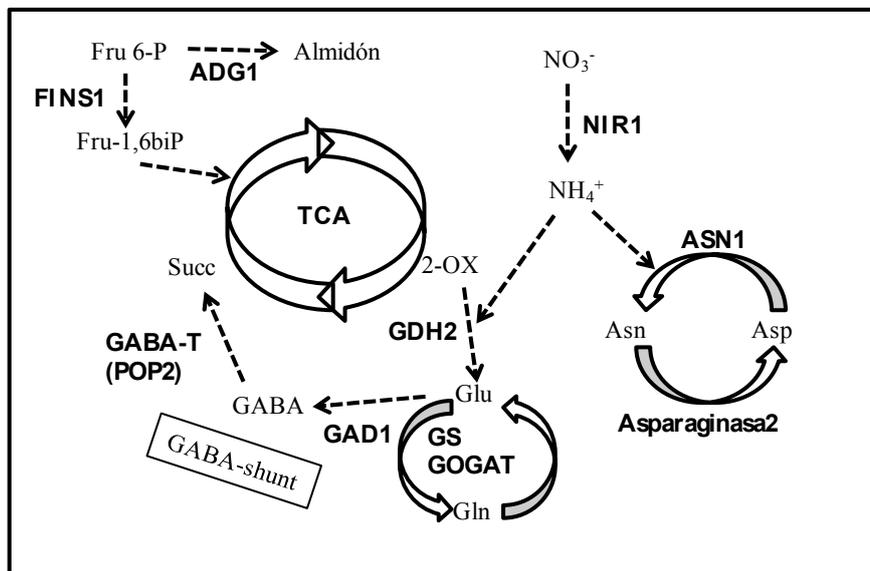
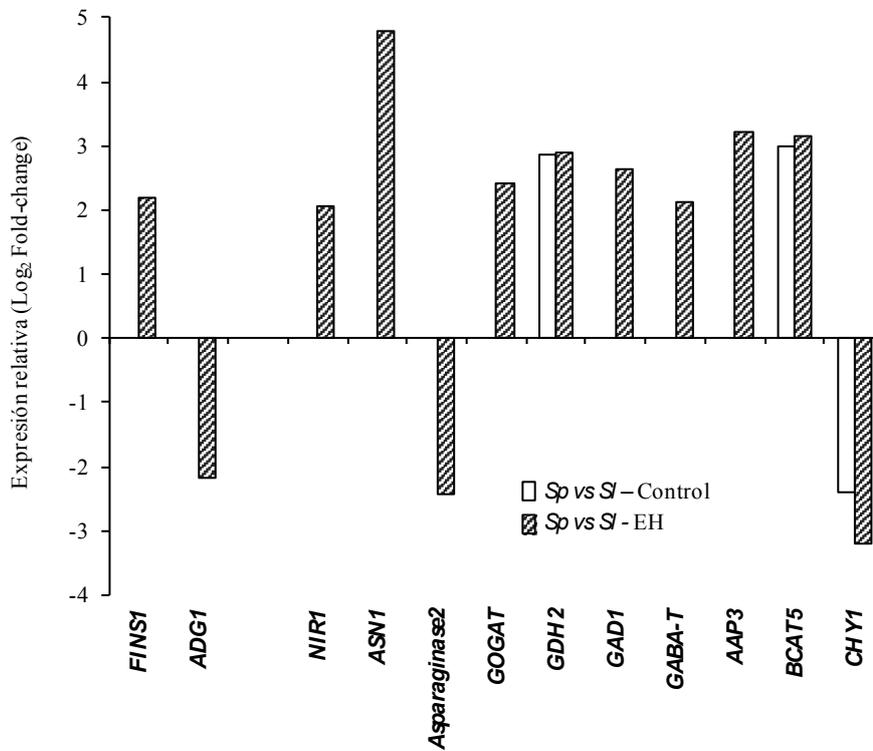


Figura 13. Diferencias de expresión entre *S. pennellii* y *S. lycopersicum* de genes relacionados con el metabolismo del carbono y nitrógeno. Las plantas de *Sp* y *Sl* se cultivaron en control (riego normal) y estrés hídrico (EH, 4 días de deshidratación por interrupción de riego).

Por otro lado, se detectó un número significativo de genes relacionados con el metabolismo del nitrógeno sobreexpresados en *Sp* respecto a *Sl*, la mayoría de ellos específicamente en condiciones de sequía (Figura 13). Así, dos genes implicados en la asimilación de nitrógeno, *nitrito reductasa 1 (NIR1)* y *asparagina sintasa dependiente de glutamina 1 (ASNI)*, estaban inducidos en estrés hídrico en *Sp*. El análisis de la expresión de *NIR1* y *ASNI* mediante RT-qPCR confirmó la misma tendencia que la obtenida en el análisis microarray (Figura 11). Cabe mencionar que una forma de reducir el exceso de NH_4^+ producido durante el estrés es integrarlo en el metabolismo de aminoácidos. En este sentido, además de la inducción de *ASNI* en *Sp* durante la deshidratación, también se detectó la inhibición del gen *asparaginasa 2* que está implicado en la reacción contraria (la producción de aspartato a partir de asparagina liberando NH_4^+).

Otro gen sobreexpresado en *Sp* respecto a *Sl* es *GLTI*, cuyo producto génico es una glutamato sintasa cloroplastidial dependiente de NADH (conocida comúnmente como glutamina-oxoglutarato aminotransferasa, GOGAT). Precisamente, otra vía metabólica para asimilar nitrógeno inorgánico, especialmente el exceso de NH_4^+ producido en condiciones de estrés, es a través de ciclo glutamina sintasa/glutamato sintasa (GS/GOGAT) (Figura 13). Un gen que codifica para el ortólogo de *glutamato deshidrogenasa 2 (GDH2)* de *Arabidopsis* estaba constitutivamente inducido en *Sp* respecto a *Sl*, y esta tendencia se mantuvo en sequía. Además, dos genes implicados en el metabolismo del ácido γ -aminobutírico (GABA), *glutamato descarboxilasa 1 (GADI)* y *γ -aminobutirato transaminasa (GABA-T)*, mostraron mayores niveles de expresión en *Sp* respecto a *Sl* específicamente durante el estrés hídrico. Otro gen inducido específicamente en *Sp* respecto a *Sl* en sequía fue el ortólogo de *aminoácido permeasa 3 (AAP3)* de *Arabidopsis*, que codifica un transportador de aminoácidos cuya función se ha relacionado con el transporte de éstos entre el citosol, la mitocondria y el cloroplasto, donde los productos de los genes mencionados anteriormente ejercen su actividad funcional. Además, el gen *BCAT5*, involucrado en la síntesis de aminoácidos de cadena ramificada (BCAA), mostró mayores niveles de transcrito en *Sp* respecto a *Sl* tanto en control como en sequía, mientras que se observó la tendencia opuesta para el gen *CHY1*, implicado en el catabolismo de BCAA. En conjunto, nuestros resultados sugieren que una estrategia de la especie silvestre *Sp* para hacer frente a la sequía es inducir la

expresión de genes implicados en el metabolismo del nitrógeno, como se muestra esquemáticamente en la Figura 13.

Genes implicados en el control de la pérdida de agua

En relación a la pérdida de agua a través de las hojas, observamos la inducción del gen *CAI*, que codifica para una anhidrasa carbónica, específicamente en *Sp* en sequía (Figura 14A), lo que concuerda con la disminución de la pérdida de agua debida a la reducción de la densidad y apertura estomáticas en la especie silvestre (Figura 9F, G).

Además, algunos genes relacionados con el metabolismo de la pared celular también se indujeron en *Sp* respecto a *Sl* en sequía, como *EXPB2*, relacionado con la extensibilidad de la pared celular, y *PARVUS/GLZ1*, implicado en su engrosamiento. Otro gen relacionado con la extensibilidad de la pared celular, *XTH16*, mostró una inducción en *Sp* tanto en control como en condiciones de estrés (Figura 14A).

Genes implicados en el metabolismo hormonal

Con respecto al metabolismo hormonal, se observó la inducción en *Sp* respecto a *Sl* de distintos genes implicados en el metabolismo de jasmonato (JA) y etileno (ET). Así, los genes *LOX3*, *AOS* y *OPR2*, involucrados en la síntesis de JA, mostraron mayores niveles de expresión en *Sp* tanto en control como en sequía. Sin embargo, el gen *JMT*, cuyo producto génico cataliza la conjugación de JA para formar el compuesto no bioactivo metil-jasmonato (MeJA), estaba inhibido en *Sp* respecto a *Sl* en sequía, debido a la inhibición específica de *JMT* en *Sp* en estrés respecto a control (Figura 14B). En cuanto al metabolismo de ET, es interesante destacar la inducción de genes específicamente en *Sp* en sequía respecto a control, resultando en una mayor expresión de estos genes en *Sp* respecto a *Sl* en condiciones de estrés (Figura 14C). Esta fue la tendencia observada en dos genes que codifican ACC oxidasas (*ACO1* y *ACO4*), implicadas en la etapa final de la síntesis de ET, y dos factores de transcripción de respuesta a ET, *ERF1B* y *ERF95*, lo que sugiere que la biosíntesis y señalización de ET son importantes en la respuesta de la especie silvestre a la sequía.

Por último, señalar que tanto en el caso de los genes que presentaban diferencias de expresión constitutivas como en los alterados por la sequía, se detectó un número elevado de genes cuya función es aún desconocida.

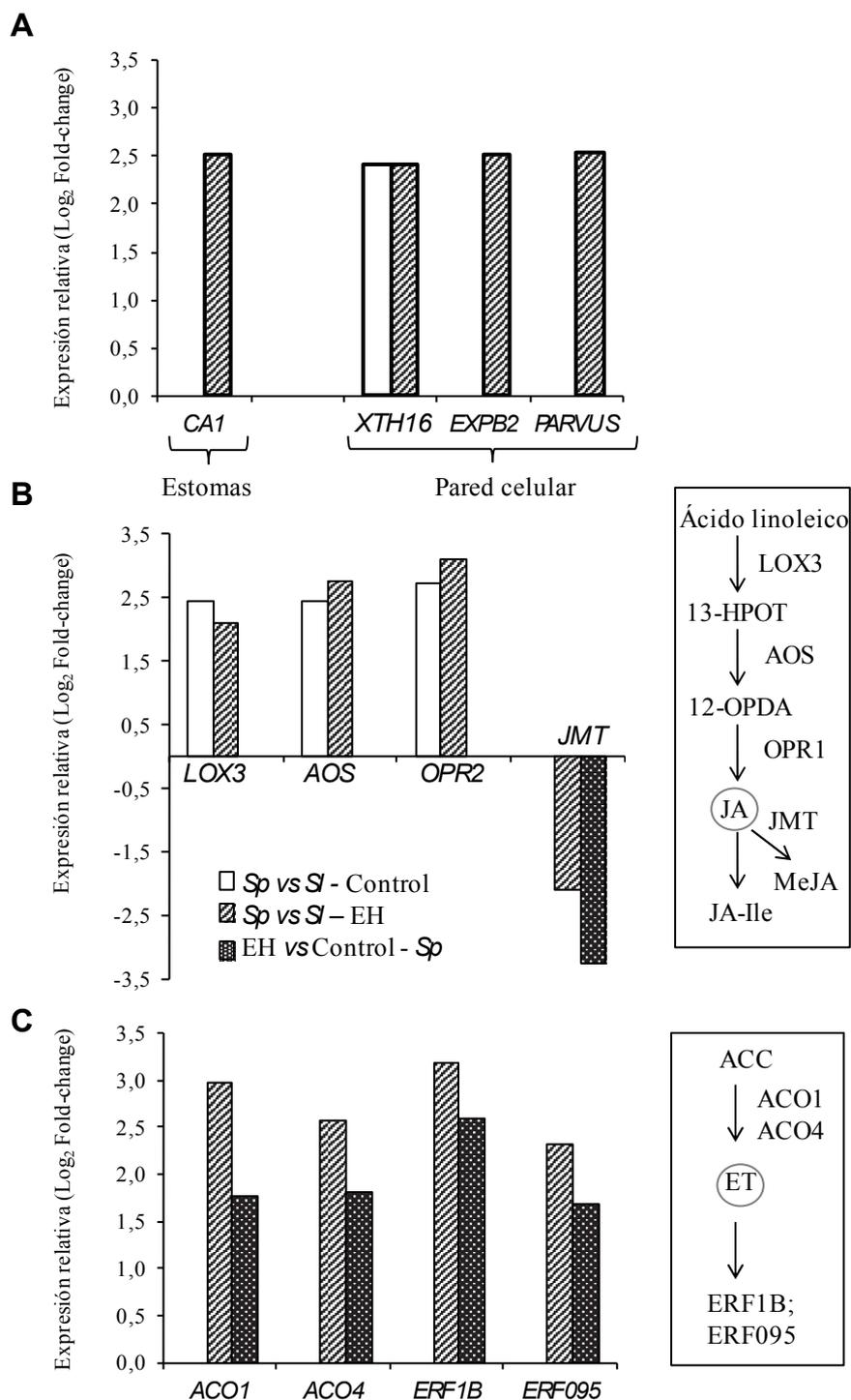


Figura 14. Genes diferencialmente expresados en *S. pennellii* (*Sp*) respecto a *S. lycopersicum* (*Sl*) en estrés hídrico (EH), y genes inducidos por el estrés hídrico en *Sp* respecto a control. Los genes que regulan el comportamiento estomático y la fisiología de la pared celular (**A**) así como los implicados en el metabolismo del jasmonato (JA) (**B**) y el etileno (ET) (**C**) estaban sobreexpresados en las hojas de *Sp* respecto a las de *Sl* en estrés hídrico. Las plantas de *Sp* y *Sl* se cultivaron en control (riego normal) y estrés hídrico (4 días de deshidratación por interrupción de riego).

3.2. Respuesta de *S. pennellii* al estrés salino

Con el fin de identificar mecanismos clave y genes implicados en la tolerancia de *S. pennellii* al estrés salino, se llevó a cabo un estudio comparativo a nivel fenotípico, fisiológico y molecular entre tomate cultivado (*Sl*) y la especie silvestre (*Sp*), cuyos resultados se presentan en los siguientes apartados.

3.2.1. Evolución del desarrollo y contenido de agua de *S. lycopersicum* y *S. pennellii* en estrés salino

Tras 7 días de tratamiento salino (DTS) *Sl* tuvo un mayor crecimiento que *Sp* en términos de producción de biomasa. Sin embargo, tras 14 DTS ambas especies mostraron una biomasa radicular similar, mientras que en la parte aérea fue significativamente superior en *Sp* (Figura 15A). La tasa media de crecimiento (MGR) ilustró claramente la evolución diferencial en el desarrollo de ambas especies durante el estrés salino, en el que parecen observarse tres fases distintas: la primera tuvo lugar entre 0-2 DTS, y en ella se observó una MGR similar en *Sp* y *Sl*; la segunda fase ocurrió entre 2-7 DTS, y en ella se detectó una tendencia positiva en la acumulación de biomasa de *Sl*, mientras que los valores de MGR se mantuvieron constantes e incluso tendieron a disminuir en *Sp*. Por último, en una tercera fase comprendida entre 7 y 14 DTS, se observaron tendencias opuestas a las de la fase anterior. Así, los valores de MGR disminuyeron significativamente en *Sl* (alrededor de un 60% tanto en raíz como en la parte aérea), mientras que en *Sp* se incrementaron 5 y 7 veces en raíz y parte aérea, respectivamente (Figura 15A). Además, mientras que en *Sp* no se observaron síntomas visuales provocados por el estrés salino tras 14 DTS, estos fueron evidentes en las plantas de *Sl*, incluyendo oscurecimiento, engrosamiento evidente de las hojas y retorcimiento de los folíolos en desarrollo (Figura 15B).

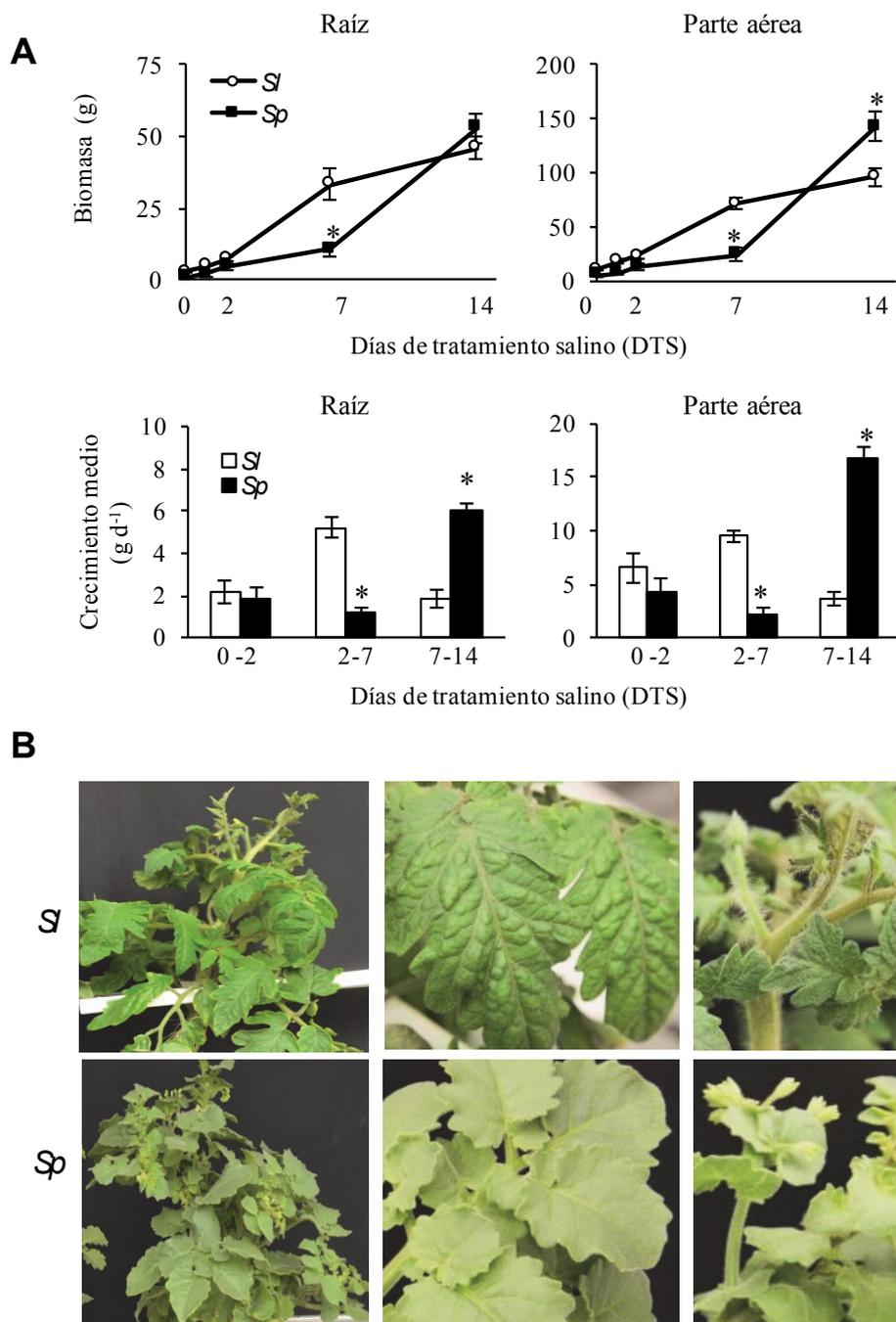


Figura 15. Evolución del desarrollo de las plantas de *S. pennellii* (*Sp*) y *S. lycopersicum* (*Sl*) sometidas a estrés salino (100 mM NaCl durante 14 días). (A) Acumulación de biomasa y crecimiento medio de la raíz y la parte aérea de plantas de *Sp* y *Sl* a lo largo del tratamiento salino. (B) Imágenes representativas de ambas especies al final del tratamiento salino. Las fotos centrales y las de la derecha son detalles de las hojas, en las que *Sl* muestra síntomas evidentes de estrés, pero no *Sp*. Los datos representan la media \pm error estándar de dos experimentos independientes, y los asteriscos indican la existencia de diferencias significativas entre las medias de *Sl* y *Sp* para cada tiempo de tratamiento (test *t* de Student, $P < 0,05$).

Se observaron diferencias notables en la acumulación de agua entre ambas especies (Figura 16). En raíz, el contenido de agua de *Sl* disminuyó durante los primeros 2 DTS y a continuación fue recuperándose progresivamente hasta alcanzar el valor inicial (día 0) tras 14 DTS. Sin embargo, el contenido de agua de *Sp* no solo no disminuyó durante el tratamiento salino, sino que aumentó gradualmente entre 2 y 14 DTS. En cuanto a las hojas, el contenido de agua en *Sl* se mantuvo constante a lo largo del tratamiento salino, mientras que en *Sp* se observó un aumento significativo y gradual desde el inicio hasta el final de la exposición al estrés. Expresando el contenido de agua como valor relativo al control (%), se observó claramente el comportamiento diferencial entre ambas especies (Figura 16).

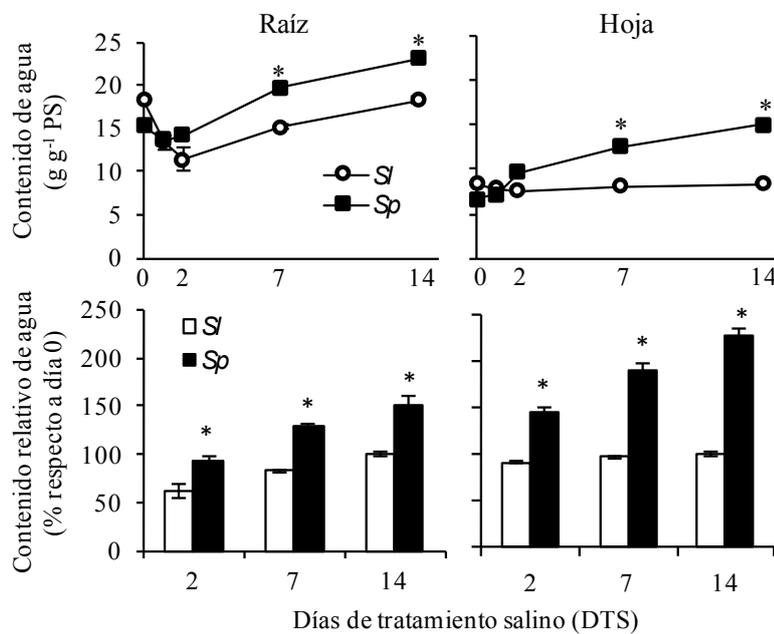


Figura 16. Evolución del contenido de agua en raíces y hojas de plantas de *S. pennellii* (*Sp*) y *S. lycopersicum* (*Sl*) sometidas a estrés salino (100 mM NaCl durante 14 días). El contenido de agua se expresó tanto en valor absoluto (g g^{-1} peso seco, PS) como en porcentaje (%) respecto al control (día 0). Los datos representan la media \pm error estándar de dos experimentos independientes, y los asteriscos indican la existencia de diferencias significativas entre las medias de *Sl* y *Sp* para cada tiempo de tratamiento (test *t* de Student, $P < 0,05$).

3.2.2. Pérdida de agua transpiracional y expresión de genes de acuaporinas en estrés salino

El alto transporte de agua a la parte aérea en *Sp* podría estar relacionado con un patrón diferencial de expresión de genes de acuaporinas, que son los principales canales proteicos implicados en el movimiento de agua a través de las membranas celulares. Para comprobar esta hipótesis, se midió la expresión de dos genes, *PIP2;1* y *TIP2;2*, que codifican acuaporinas localizadas en la membrana plasmática y del tonoplasto, respectivamente (Reuscher *et al.*, 2013), mediante RT-qPCR en *Sl* y *Sp* durante los primeros 7 DTS (Figura 17A).

En ausencia de estrés (0 DTS) la expresión de *PIP2;1* era menor en raíces y mayor en hojas de *Sp* respecto a *Sl*. Durante el estrés salino, la expresión de *PIP2;1* tendió a disminuir en la raíz de ambas especies pero esta tendencia fue más acusada en *Sl*, de manera que no se detectaron diferencias entre ambas especies tras 7 DTS. Por otro lado, en las hojas, la expresión de *PIP2;1* se mantuvo constante entre 0-2 DTS y a continuación disminuyó, contrariamente a la tendencia observada en las hojas de *Sl*. En cuanto a *TIP2;2*, no se detectaron diferencias de expresión significativas entre *Sp* y *Sl* ni en raíces ni en hojas.

Por otra parte, el elevado contenido de agua en las hojas de *Sp* respecto a *Sl* también podría estar relacionado con una menor pérdida de agua en condiciones de estrés salino. Para estudiar esta posibilidad, se midió la temperatura (T^a) de la hoja durante 0-7 DTS mediante termografía infrarroja (TI), pudiendo observarse dos fases diferentes (Figura 17B): en la primera (0-2 DTS), se observó un incremento significativo de la T^a de la hoja en ambas especies, siendo incluso mayor en *Sl* tras 1 DTS y similar tras 2 DTS; no obstante, en la segunda fase (2-7 DTS), ambas especies mostraron un comportamiento diferente, ya que en *Sl* la T^a foliar se redujo hasta recuperar el valor inicial tras 5 y 7 DTS, mientras que en *Sp* se mantuvo constante y significativamente superior a la de *Sl* tras 7 DTS. En la Figura 17B se muestran imágenes térmicas representativas de plantas de *Sp* y *Sl* tras 7 DTS (a la derecha en cada imagen) comparadas con plantas en control (a la izquierda), ilustrando cómo la especie silvestre mantuvo una T^a foliar más elevada que la especie cultivada tras 7 DTS. En conjunto, estos resultados sugieren que la capacidad de *Sp* para regular la pérdida de agua por transpiración junto a la elevada

expresión basal de *PIP2;1* son factores clave en la respuesta de la especie silvestre al estrés salino.

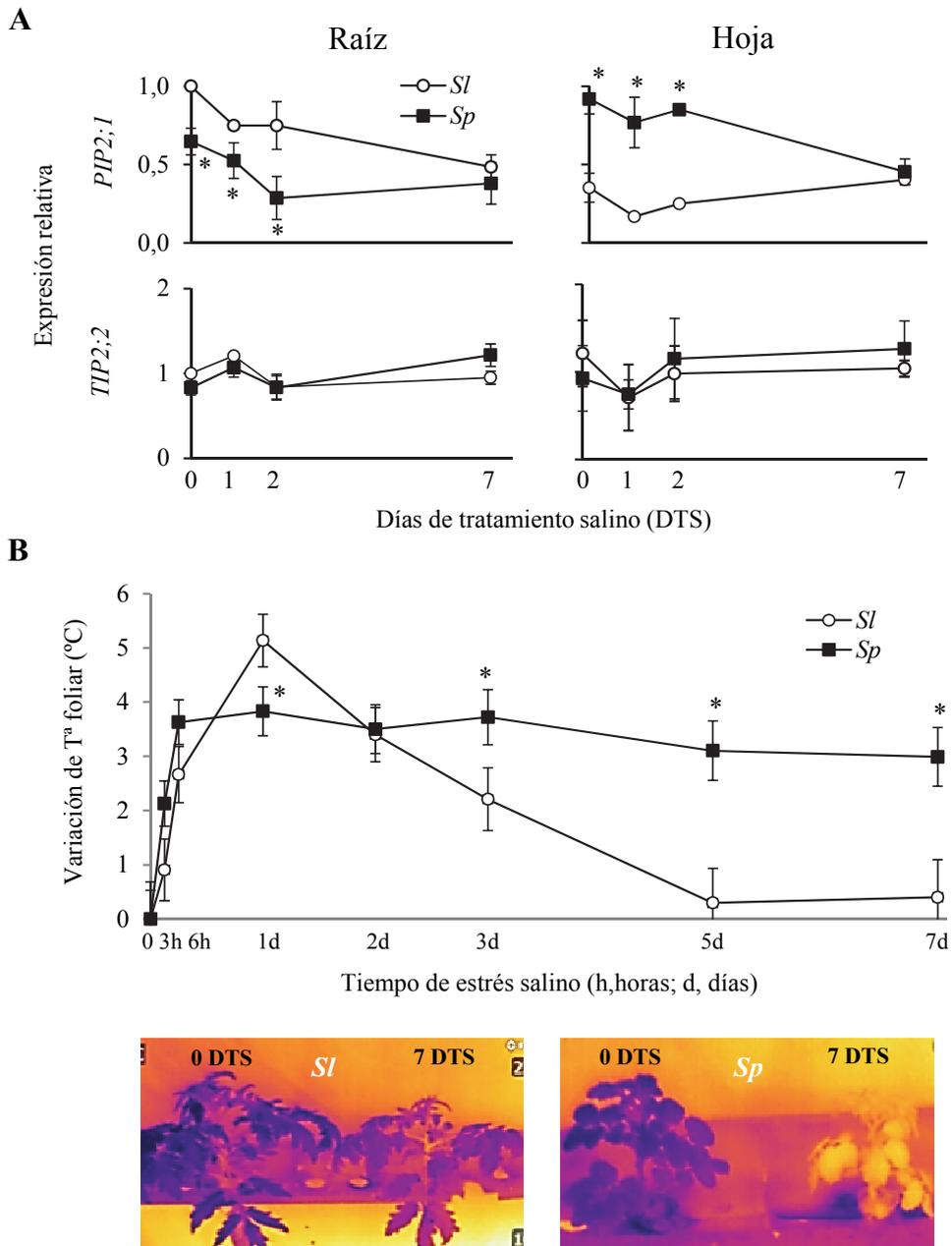


Figura 17. Análisis de expresión de genes que codifican acuaporinas y evolución de la temperatura foliar de *S. lycopersicum* (*Sl*) y *S. pennellii* (*Sp*). **(A)** Análisis por RT-qPCR de la expresión de *PIP2;1* y *TIP2;2* en raíces y hojas de *Sl* y *Sp* a lo largo de 7 días de estrés salino (DTS). Los datos mostrados son relativos a la expresión obtenida en la raíz de *Sl* en control (0 DTS), a la que se le dio valor 1. **(B)** Variación de la temperatura (T^a) foliar determinada por termografía infrarroja en ambas especies a lo largo de 7 DTS. En la parte inferior se muestran imágenes térmicas representativas de plantas de *Sl* y *Sp* durante 0 y 7 DTS. Los valores de temperatura se representan mediante una escala de color, desde el morado (16 °C) al amarillo (24 °C). Los datos representan la media \pm error estándar de dos experimentos independientes, y los asteriscos indican la existencia de diferencias significativas entre las medias de *Sl* y *Sp* para cada tiempo de tratamiento (test *t* de Student, $P < 0,05$).

3.2.3. Evolución de la densidad y apertura estomática y cambios anatómicos en células del mesófilo en tomate cultivado y *S. pennellii*

A continuación, se evaluó si la menor pérdida de agua por transpiración observada en *Sp* se debía a cambios inducidos por el estrés salino en el número de poros estomáticos (densidad estomática e índice estomático) así como en la apertura estomática (Figura 18).

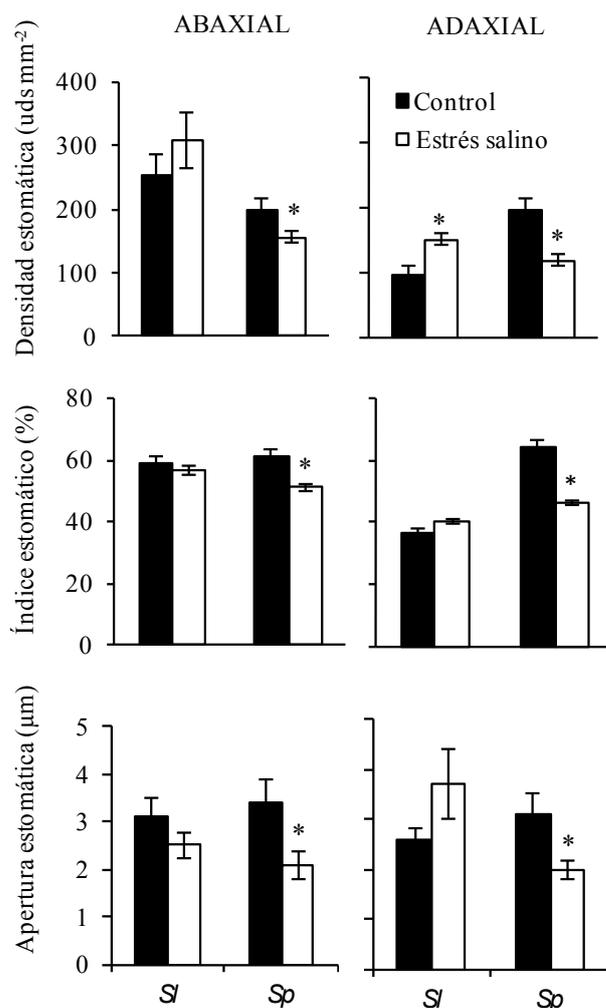


Figura 18. Densidad y apertura estomática en hojas de plantas de *S. pennellii* (*Sp*) y *S. lycopersicum* (*Sl*) en ausencia de estrés (control) y tras 7 días de estrés salino (100 mM NaCl). (A) Densidad estomática, índice estomático y apertura estomática en la superficie adaxial y abaxial de la hoja de plantas de *Sl* y *Sp* en control y estrés salino. Los datos representan la media \pm error estándar de dos experimentos independientes, y los asteriscos indican la existencia de diferencias significativas entre control y estrés salino para cada especie (test *t* de Student, $P < 0,05$).

En condiciones control la densidad estomática en *Sl* fue mayor en la superficie abaxial que en la adaxial, mientras que en *Sp* se obtuvieron valores similares en ambas superficies (Figura 18). Sin embargo, en estrés salino (7 DTS) la densidad estomática se redujo en la superficie abaxial de *Sp* aproximadamente un 25% y la reducción fue aún mayor en la adaxial (un 40%), mientras que en *Sl* se observó un incremento aproximado del 60% en la cara adaxial. Puesto que el índice estomático no varió en la especie cultivada con el estrés salino (Figura 18), el incremento observado en la densidad estomática estaba relacionado con una disminución del tamaño de las células epidérmicas tras 7 DTS. Por el contrario, el índice estomático mostró la misma tendencia en *Sp* que la densidad estomática, observándose una reducción significativa en ambas superficies tras 7 DTS, lo que refleja que el tamaño de las células epidérmicas de *Sp* no varió significativamente en estrés salino respecto a control, sino que se produjo una disminución en el número de estomas con la salinidad. Respecto a la apertura estomática, no se observaron cambios significativos ni en la superficie abaxial ni en la adaxial de las hojas de *Sl* en estrés salino respecto a control, mientras que en *Sp* se observó una reducción significativa en ambas superficies (aproximadamente del 40% en cada una). Estos resultados corroboraron que la adaptación de *Sp* a la salinidad está relacionada con su habilidad para reducir el número de estomas y su apertura.

La medida de la T^a foliar puede reflejar no solo el flujo de agua a través de los estomas sino también a través de la cutícula, cuyo grado de espesor puede afectar a la pérdida de agua por transpiración (Koenig *et al.*, 2014). Por ello, a continuación se midió el grosor de la cutícula en la superficie abaxial y adaxial de las hojas de *Sl* y *Sp* (Figura 19). Sin embargo, no se detectaron diferencias en la cara adaxial, y en la cara abaxial el estrés salino indujo un aumento del grosor de la cutícula similar en ambas especies, de manera que no se observaron diferencias significativas entre *Sl* y *Sp* ni en control ni tras 7 DTS.

A

	Grosor de la cutícula (μm)			
	Control		Estrés salino	
	<i>Sl</i>	<i>Sp</i>	<i>Sl</i>	<i>Sp</i>
Adaxial	25,32 \pm 2,09 a	26,34 \pm 5,28 a	25,41 \pm 3,97 a	28,94 \pm 7,69 a
Abaxial	22,22 \pm 3,74 bc	17,89 \pm 1,61 c	33,44 \pm 5,87 a	25,93 \pm 2,03 ab

B

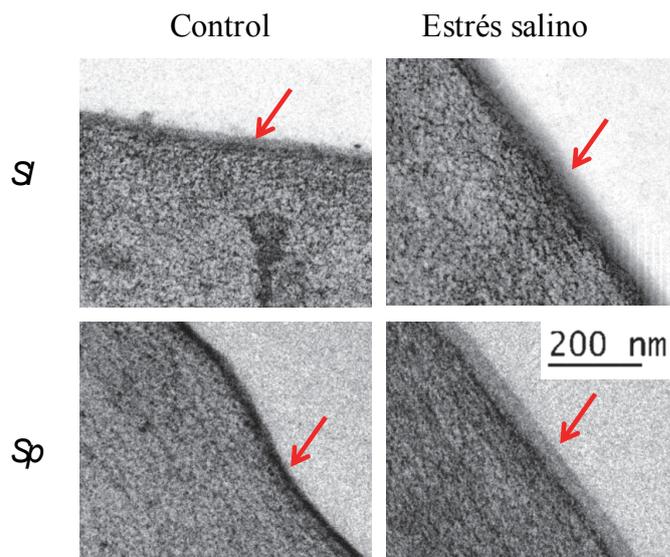


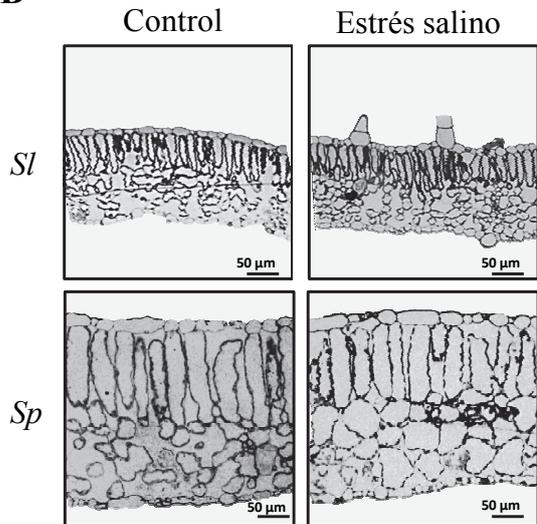
Figura 19. Grosor de la cutícula de la hoja de *S. lycopersicum* (*Sl*) y *S. pennellii* (*Sp*). **(A)** El espesor de la cutícula se calculó en la superficie adaxial y abaxial de la hoja de *Sl* y *Sp* en ausencia de estrés (control) y tras 7 días de estrés salino (100 mM NaCl). **(B)** Imágenes representativas obtenidas mediante microscopía electrónica de transmisión de la cutícula de la superficie abaxial de la hoja de ambas especies en control y estrés salino (las flechas rojas señalan la superficie cuticular). Los datos representan la media \pm error estándar de dos experimentos independientes. Los valores con letras diferentes indican diferencias significativas entre medias (*LSD*, $P < 0,05$).

Otro factor crítico que puede influir en la pérdida de agua por transpiración es la estructura morfológica de la hoja (Franco-Navarro *et al.*, 2016). Como cabía esperar, se detectaron importantes diferencias morfológicas entre las hojas de *Sl* y *Sp*, especialmente en el espesor de la hoja, el cual fue notablemente superior en *Sp* tanto en control como en estrés salino (Figura 20A, B).

A

	Control		Estrés salino	
	<i>Sl</i>	<i>Sp</i>	<i>Sl</i>	<i>Sp</i>
Grosor foliar (μm)	170,30 \pm 7,81 b	319,66 \pm 20,42 a	155,76 \pm 11,81 b	299,92 \pm 11,07 a
Parénquima empalizada				
Tamaño celular (μm^2)	180,43 \pm 8,73 b	1.099,23 \pm 63,04 a	119,20 \pm 7,42 c	964,62 \pm 92,33 a
Densidad celular (células mm^{-2})	289,58 \pm 22,90 b	152,08 \pm 15,50 c	487,50 \pm 81,97 a	200,00 \pm 40,70 c
Parénquima esponjoso				
Tamaño celular (μm^2)	90,00 \pm 5,97 c	336,32 \pm 31,17 b	67,17 \pm 3,90 d	648,33 \pm 51,16 a
Densidad celular (células mm^{-2})	427,08 \pm 21,62 b	318,75 \pm 44,31 c	608,33 \pm 73,34 a	329,55 \pm 37,42 c

B



C

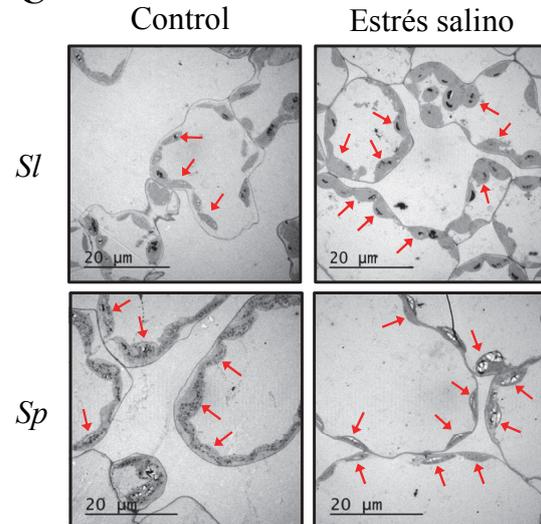


Figura 20. Diferencias anatómicas existentes en el mesófilo foliar de *S. lycopersicum* (*Sl*) y *S. pennellii* (*Sp*). **(A)** Grosor de la hoja, tamaño y densidad de las células del parénquima en empalizada y esponjoso de *Sl* y *Sp* en ausencia de estrés (control) y tras 7 días de estrés salino (100 mM NaCl). Los datos representan la media \pm error estándar de dos experimentos independientes. Los valores con letras diferentes indican diferencias significativas entre medias (*LSD*, $P < 0,05$). **(B)** Imágenes de secciones transversales de la hoja de *Sl* y *Sp* en control y estrés salino obtenidas por microscopía óptica. **(C)** Imágenes de células del parénquima esponjoso de las hojas de *Sl* y *Sp* en control y estrés salino obtenidas mediante microscopía electrónica de transmisión. Las flechas rojas indican la posición de algunos cloroplastos dentro de la célula.

Además, las células del mesófilo (parénquima en empalizada y esponjoso) de *Sp* tenían un tamaño significativamente mayor. Tras 7 DTS, las células mesofílicas de *Sl* redujeron su tamaño, y en especial las células del parénquima en empalizada parecían más delgadas y contraídas, resultando en una mayor densidad celular (Figura 20A). Por el contrario, en *Sp* la salinidad causó un aumento del tamaño de las células del parénquima esponjoso, que se expandieron y minimizaron los espacios intercelulares,

como se ilustra en la Figura 20B. Mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM) observamos que este incremento del tamaño de las células del parénquima esponjoso en *Sp* se debía fundamentalmente a un aumento del volumen vacuolar, que ocupaba prácticamente todo el espacio celular, confinando y presionando el citoplasma y los cloroplastos contra la membrana plasmática (Figura 20C). Este resultado está en consonancia con la mayor turgencia y contenido de agua observado en las hojas de *Sp* en estrés salino. Por el contrario, en *Sl* se observó una mayor relación citoplasma/vacuola con la salinidad, y las vacuolas mostraron un aspecto más constreñido que en control.

3.2.4. Acumulación de solutos en raíces y hojas de tomate y *S. pennellii*

La diferente capacidad de acumulación de agua de *Sl* y *Sp* puede distorsionar la interpretación de los resultados de acumulación iónica, ya que la respuesta fisiológica podría interpretarse de forma diferente dependiendo de si el contenido de iones se expresa en base al peso seco (PS) o en base al contenido de agua tisular (mM), y por este motivo calculamos el contenido de iones siguiendo ambos criterios. Respecto al contenido de Na^+ , no se observaron diferencias significativas entre las raíces de ambas especies en base al PS, y el contenido fue menor en *Sp* que en *Sl* en mM (Figura 21A). En hojas, por otro lado, las diferencias fueron más acusadas, pudiendo distinguirse tres fases: en la primera de ellas (0-2 DTS) la acumulación de Na^+ fue similar en ambas especies; en la segunda fase (2-7 DTS) el contenido de Na^+ aumentó significativamente en ambas especies, pero el incremento fue mayor en las hojas de *Sp*; por último, en la tercera fase (7-14 DTS), la acumulación de Na^+ fue considerablemente más lenta que en la anterior en *Sp* y *Sl*, aunque fue en esta fase donde se alcanzaron las mayores diferencias de acumulación entre ambas especies. Aunque el Na^+ se encontraba diluido en las hojas de *Sp* debido al notable incremento de su contenido de agua, la especie silvestre mantuvo una concentración de Na^+ mayor que *Sl* en base al contenido de agua entre 7 y 14 DTS, si bien las diferencias fueron considerablemente menores que al expresar los resultados en base al PS (Figura 21A).

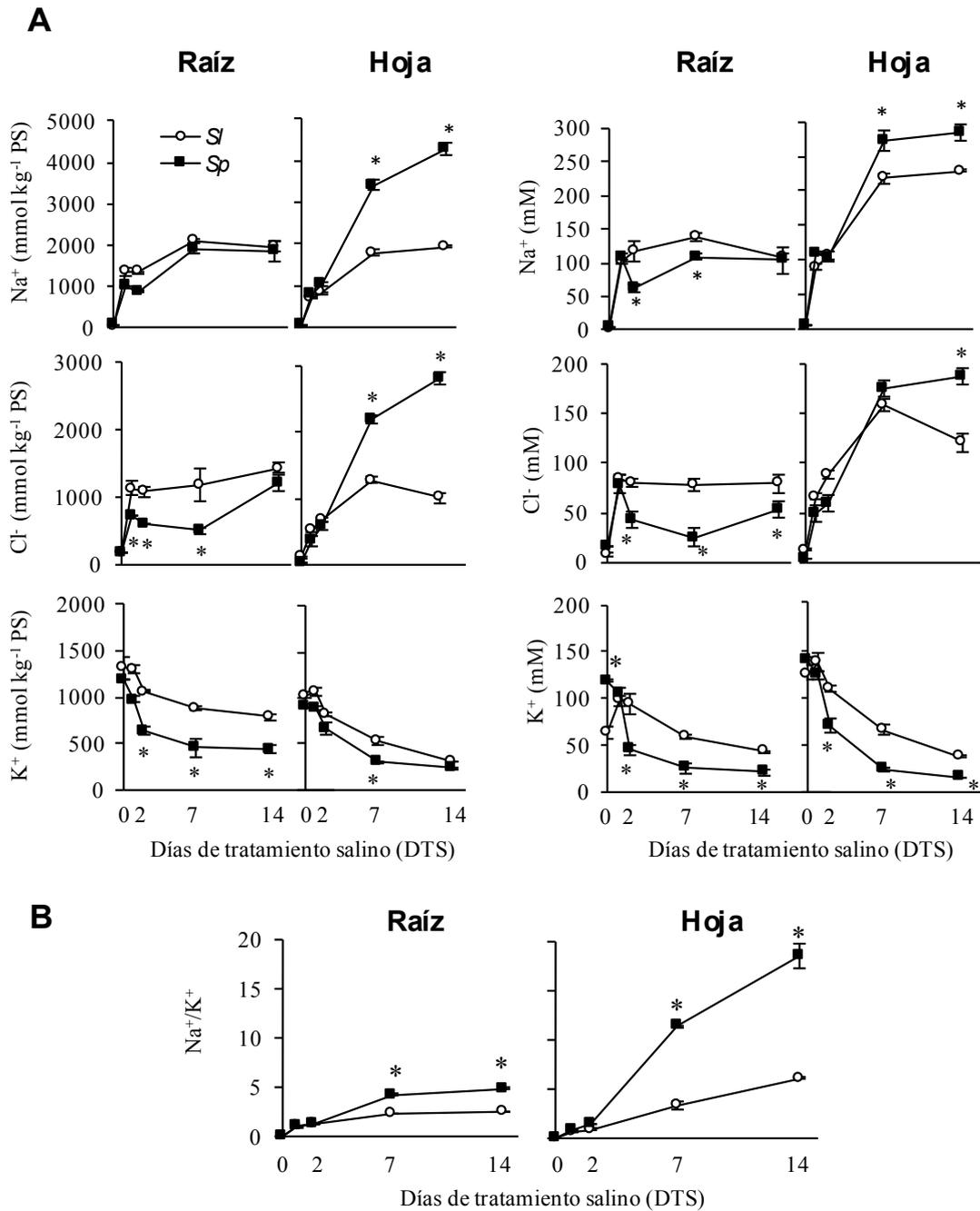


Figura 21. Transporte de iones en *S. pennellii* (*Sp*) y *S. lycopersicum* (*Sl*) a lo largo del estrés salino (100 mM NaCl durante 14 días). **(A)** Evolución del contenido de Na^+ , Cl^- y K^+ en raíces y hojas de *Sp* y *Sl*. El contenido de iones se expresa tanto en base al peso seco (PS, izquierda) como al agua tisular (mM, derecha). **(B)** Relación Na^+/K^+ en raíz y hoja para ambas especies. Los datos representan la media \pm error estándar de dos experimentos independientes, y los asteriscos indican la existencia de diferencias significativas entre las medias de *Sl* y *Sp* para cada tiempo de tratamiento (test *t* de Student, $P < 0,05$).

Los patrones de acumulación de Cl^- fueron similares a los observados para el Na^+ , aunque se detectaron algunas diferencias entre ellos (Figura 21A). En general, la acumulación de Cl^- fue inferior a la de Na^+ para ambas especies. Además, en raíz se observó una menor acumulación de Cl^- en *Sp* al expresar los datos tanto en PS como mM, y en hoja, el contenido de Cl^- disminuyó en *Sl* entre 7 y 14 DTS, en contraposición al aumento de Na^+ observado. Estos resultados parecen indicar que el Na^+ tiene más relevancia en la toxicidad iónica en tomate que el Cl^- . La evolución del contenido de K^+ también fue analizada en raíz y hoja, revelando su disminución a lo largo del tratamiento salino en ambas especies, si bien esta disminución fue significativamente mayor en *Sp*. La elevada acumulación de Na^+ en las hojas de *Sp*, sumada a la considerable reducción de su contenido de K^+ , resultaron en un aumento pronunciado de la relación Na^+/K^+ en la especie silvestre a partir de 2 DTS, llegando a ser tres veces superior a la de *Sl* tras 14 DTS (Figura 21B).

Considerando el elevado contenido de iones salinos alcanzados en las hojas de *Sp* tras 14 DTS y la alta tasa de crecimiento observada en este periodo (Figura 15A), también se analizó en las hojas de ambas especies el contenido de los principales solutos orgánicos que contribuyen al ajuste osmótico, azúcares y ácidos orgánicos (Tabla 13). Los resultados indicaron que, en efecto, la elevada acumulación de solutos inorgánicos en las hojas de *Sp* estaba asociada con una menor acumulación de azúcares y ácidos orgánicos. Además, se calculó el potencial osmótico de la hoja (ψ_π) y la contribución de los solutos orgánicos e inorgánicos (%) a dicho potencial (Tabla 13). De esta forma se observó que, aunque ψ_π era más negativo en las hojas de *Sp* que en las de *Sl* en control, no se detectaron diferencias entre especies en términos absolutos al final del tratamiento (14 DTS) debido al mayor contenido de agua de *Sp*. No obstante, cuando se calculó el ψ_π relativo al estado inicial de hidratación de cada especie, el resultado fue significativamente más negativo en *Sp* que en *Sl* tras 14 DTS. Además, la contribución de solutos orgánicos e inorgánicos al ψ_π , que fue similar en ambas especies en control, difirió notablemente tras 14 DTS. Así, la contribución de los solutos inorgánicos al ψ_π fue superior en *Sp* que en *Sl*, mientras que se observó la tendencia opuesta en el caso de los solutos orgánicos. Estos resultados indican que *Sp* requiere una acumulación menor de solutos orgánicos para llevar a cabo el balance osmótico, y por tanto quedarían disponibles para favorecer el crecimiento en condiciones de salinidad.

Tabla 13. Diferencias entre *S. lycopersicum* (*Sl*) y *S. pennellii* (*Sp*) en las concentraciones de los principales azúcares y ácidos orgánicos en hoja, valores de potencial osmótico absoluto y relativo ($\Psi\pi$), y contribución relativa de solutos al potencial osmótico. Los análisis se realizaron en hojas procedentes de plantas desarrolladas sin sal (control) y en 100 mM NaCl durante 14 días (estrés salino). Los datos representan la media \pm error estándar de dos experimentos independientes. Los valores con letras diferentes indican diferencias significativas entre medias (*LSD*, $P < 0,05$).

	Control		Estrés salino	
	<i>Sl</i>	<i>Sp</i>	<i>Sl</i>	<i>Sp</i>
Azúcares (mM)				
Sacarosa	1,60 \pm 0,02 a	0,81 \pm 0,03 b	1,58 \pm 0,07 a	0,77 \pm 0,06 b
Glucosa	3,54 \pm 0,10 c	5,38 \pm 0,57 b	7,74 \pm 0,29 a	3,07 \pm 0,15 d
Fructosa	9,32 \pm 0,04 b	8,07 \pm 0,61 c	10,87 \pm 0,58 a	4,24 \pm 0,08 d
Ácidos orgánicos (mM)				
Cítrico	26,13 \pm 0,98 a	16,63 \pm 0,67 b	16,97 \pm 2,13 b	5,32 \pm 0,39 c
Málico	13,63 \pm 0,30 a	6,89 \pm 0,30 b	7,39 \pm 0,57 b	1,80 \pm 0,09 c
Succínico	38,10 \pm 1,06 c	106,49 \pm 6,97 a	49,51 \pm 0,87 b	10,58 \pm 1,41 d
Potencial osmótico, $\Psi\pi$ (Mpa)	-0,89 \pm 0,02 a	-1,09 \pm 0,01 b	-1,67 \pm 0,04 c	-1,70 \pm 0,08 c
$\Psi\pi$ relativo (Mpa)	-0,89 \pm 0,02 a	-1,09 \pm 0,01 b	-1,68 \pm 0,04 c	-3,87 \pm 0,08 d
Contribución de solutos a $\Psi\pi$ (%)				
Inorgánicos	75,10 \pm 3,70 c	73,10 \pm 2,40 c	81,70 \pm 2,30 b	95,10 \pm 4,30 a
Orgánicos	24,90 \pm 0,70 a	26,90 \pm 1,80 a	18,30 \pm 0,90 b	4,90 \pm 0,40 c

3.2.5. Análisis de expresión de genes implicados en la homeostasis de Na⁺

A continuación, analizamos la expresión de *SOS1*, *HKT1;1* y *HKT1;2*, implicados en la absorción y transporte a larga distancia de Na⁺ en tomate (Olías *et al.*, 2009; Asins *et al.*, 2013), y *NHX3* y *NHX4*, involucrados en la acumulación de Na⁺ en la vacuola (Gálvez *et al.*, 2012), en raíces y hojas de *Sp* y *Sl* (Figura 22).

En la raíz, los niveles basales de expresión (0 DTS) de *SOS1* fueron similares en *Sp* y *Sl*, mientras la expresión de *HKT1;2* fue menor en *Sp* que en *Sl*. En cuanto a la isoforma *HKT1;1*, no se detectó su expresión ni en raíces ni en hojas en ninguna de las dos especies. Durante los primeros 2 DTS, el estrés salino provocó cambios de expresión en *SOS1* y *HKT1;2* similares en las raíces de ambas especies, mientras que las diferencias más importantes se observaron entre 2-7 DTS. Así, la expresión de *SOS1* fue menor en

Sl que en *Sp* tras 7 DTS, mientras que se observó la tendencia contraria para *HKT1;2*, de manera que su expresión fue significativamente mayor en la especie cultivada. Además, el nivel de expresión de *NHX3* se mantuvo prácticamente constante durante el tratamiento salino, siendo constitutivamente superior en las raíces de *Sl* respecto a *Sp*. Por otro lado, la expresión de *NHX4* no varió significativamente en *Sp* durante el tratamiento salino, mientras que en las raíces de *Sl* la expresión de *NHX4* alcanzó un nivel 5 veces superior al basal tras 7 DTS (Figura 22).

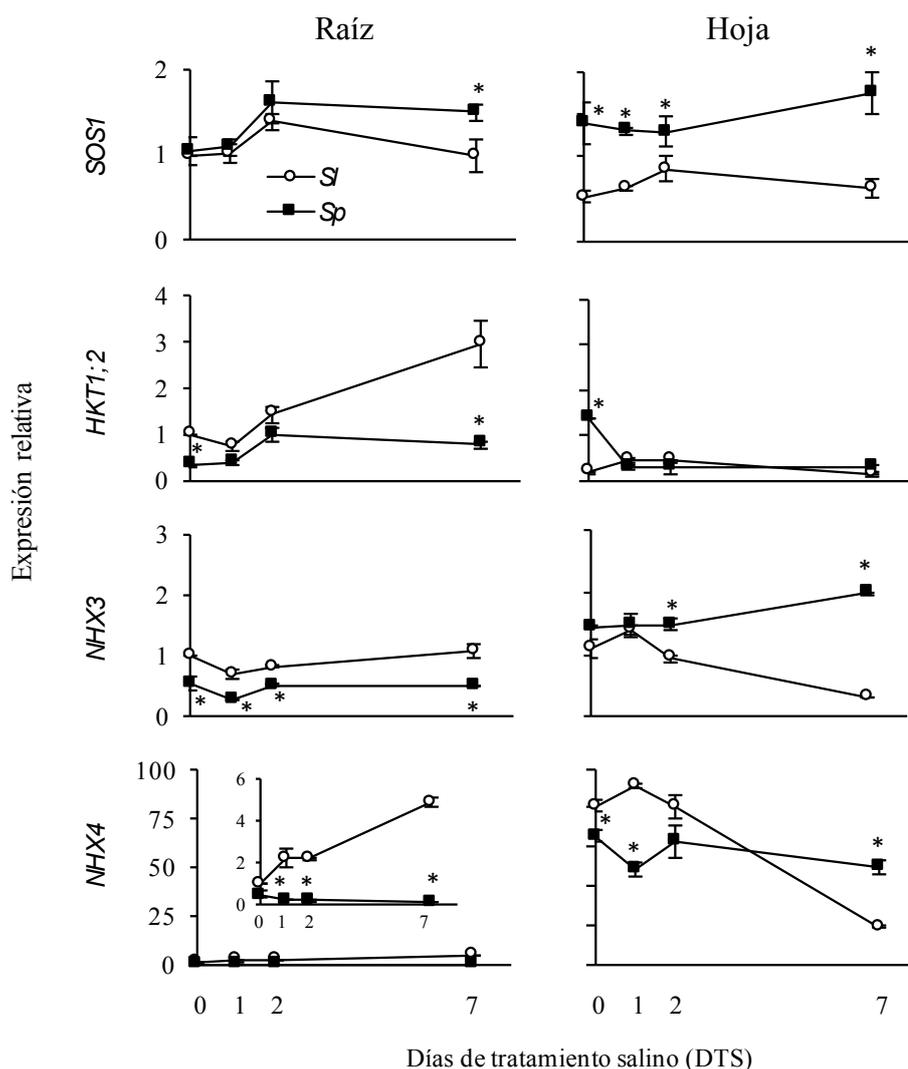


Figura 22. Análisis por RT-qPCR de los principales genes implicados en la homeostasis de Na^+ en *S. lycopersicum* (*Sl*) y *S. pennellii* (*Sp*). Evolución de la expresión de *SOS1*, *HKT1;2*, *NHX3* y *NHX4* en raíces y hojas de *Sl* y *Sp* a lo largo de 7 días de tratamiento salino (DTS, 100 mM NaCl). Los datos mostrados son relativos a la expresión obtenida en la raíz de *Sl* en control (0 DTS), a la que se asignó valor 1. Los datos representan la media \pm error estándar de dos experimentos independientes, y los asteriscos indican la existencia de diferencias significativas entre las medias de *Sl* y *Sp* para cada tiempo de tratamiento (test *t* de Student, $P < 0,05$).

En cuanto a las hojas, la expresión basal de *SOS1* y *HKT1;2* fue superior en *Sp* respecto a *Sl*. En el caso de *SOS1*, la mayor expresión en *Sp* se mantuvo a lo largo de los 7 DTS, mientras que la expresión de *HKT1;2* se redujo drásticamente tras 1 DTS y se igualó a la de *Sl* hasta el final del tratamiento. En cuanto a los genes *NHXs*, es interesante señalar la inhibición de *NHX3* y, especialmente, la de *NHX4* entre 2 y 7 DTS en *Sl* pero no en *Sp*. Estos resultados ponen de manifiesto las importantes diferencias entre especies en los patrones de expresión de genes clave en la homeostasis de Na^+ .

3.3. Caracterización fenotípica, fisiológica y molecular del mutante *pennellii salt hypersensitive (psh)*

3.3.1. Diferencias fenotípicas y anatómicas inducidas por la salinidad en el mutante

Las plantas del mutante *psh* son indistinguibles de las WT en ausencia de estrés salino. Sin embargo, tan solo 3 días después de la exposición a 100 mM NaCl, las hojas del mutante mostraron un color verde más claro, que evolucionó hacia una marcada clorosis tras 14 DTS, acompañada de una inhibición del crecimiento y el engrosamiento de los folíolos (Figura 23). La inhibición del crecimiento se vio reflejada en las diferencias de acumulación de biomasa entre WT y *psh* a lo largo del tratamiento salino, de manera que la cantidad de biomasa seca acumulada en raíz, tallo y hojas del mutante fue significativamente menor que en WT (Figura 24A). Por otro lado, no se observaron diferencias entre ambos genotipos en la acumulación de biomasa fresca en hojas al final del tratamiento salino, y ésta fue incluso mayor en *psh* tras 3 días de estrés salino, lo que sugiere la existencia de diferencias significativas en el contenido de agua en las hojas de ambos genotipos.

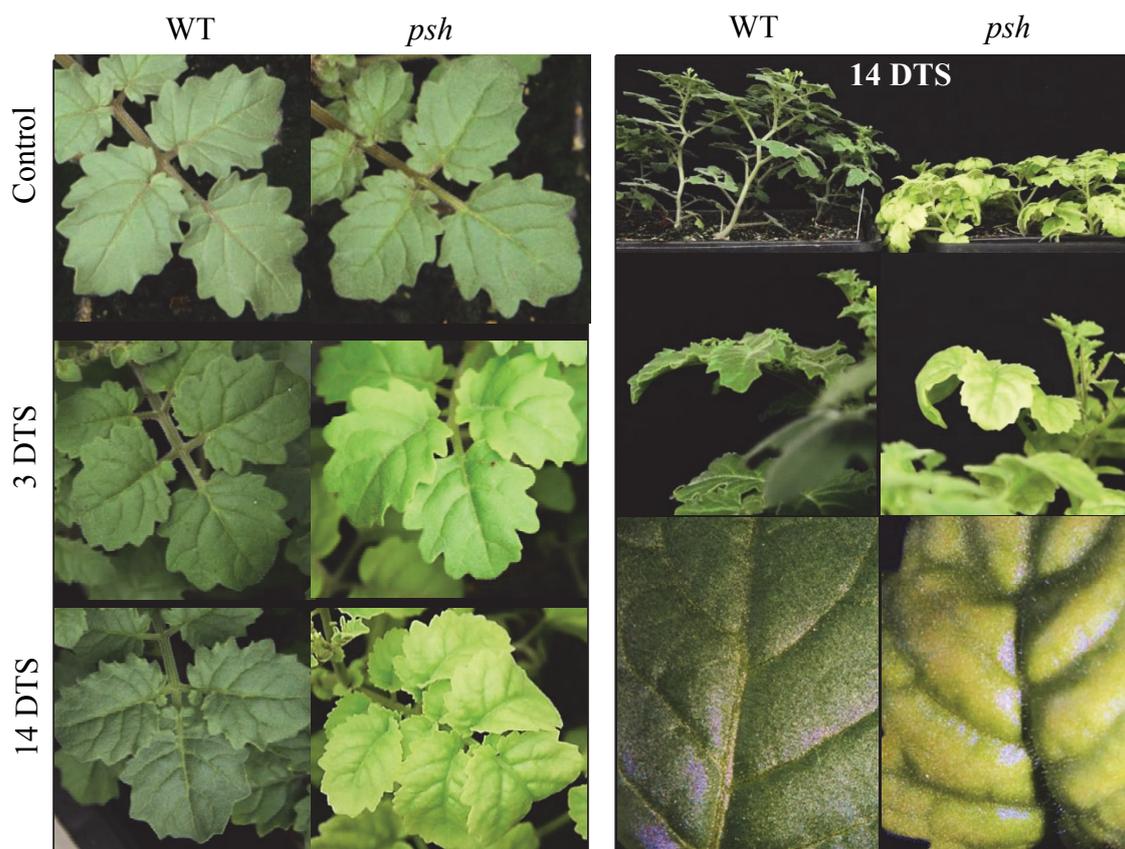


Figura 23. Evolución fenotípica de plantas WT y del mutante *psh* sometidas a estrés salino. A la izquierda, imágenes de la primera hoja desarrollada de WT y *psh* en ausencia de estrés (control) y tras 3 y 14 días de estrés salino, DTS (100 mM NaCl). A la derecha, imágenes representativas y detalles de folíolos de WT y *psh* al final del tratamiento salino (14 DTS).

Respecto a la clorosis observada en el mutante, ésta estaba relacionada con una disminución significativa del contenido de clorofila de las hojas y de la eficacia fotoquímica del fotosistema II en estrés salino (Figura 24B). Es interesante señalar que el fenotipo clorótico del mutante *psh*, que era evidente a partir de 3 días de exposición a 100 mM NaCl, desaparecía cuando las plantas dejaban de regarse con sal. Así, en plantas regadas durante 5 días con sal y posteriormente 9 días con solución control se observó la desaparición de la clorosis foliar y la recuperación parcial del fenotipo WT, con un desarrollo de biomasa intermedio entre las plantas WT y mutantes sometidas a 14 DTS (Figura 25).

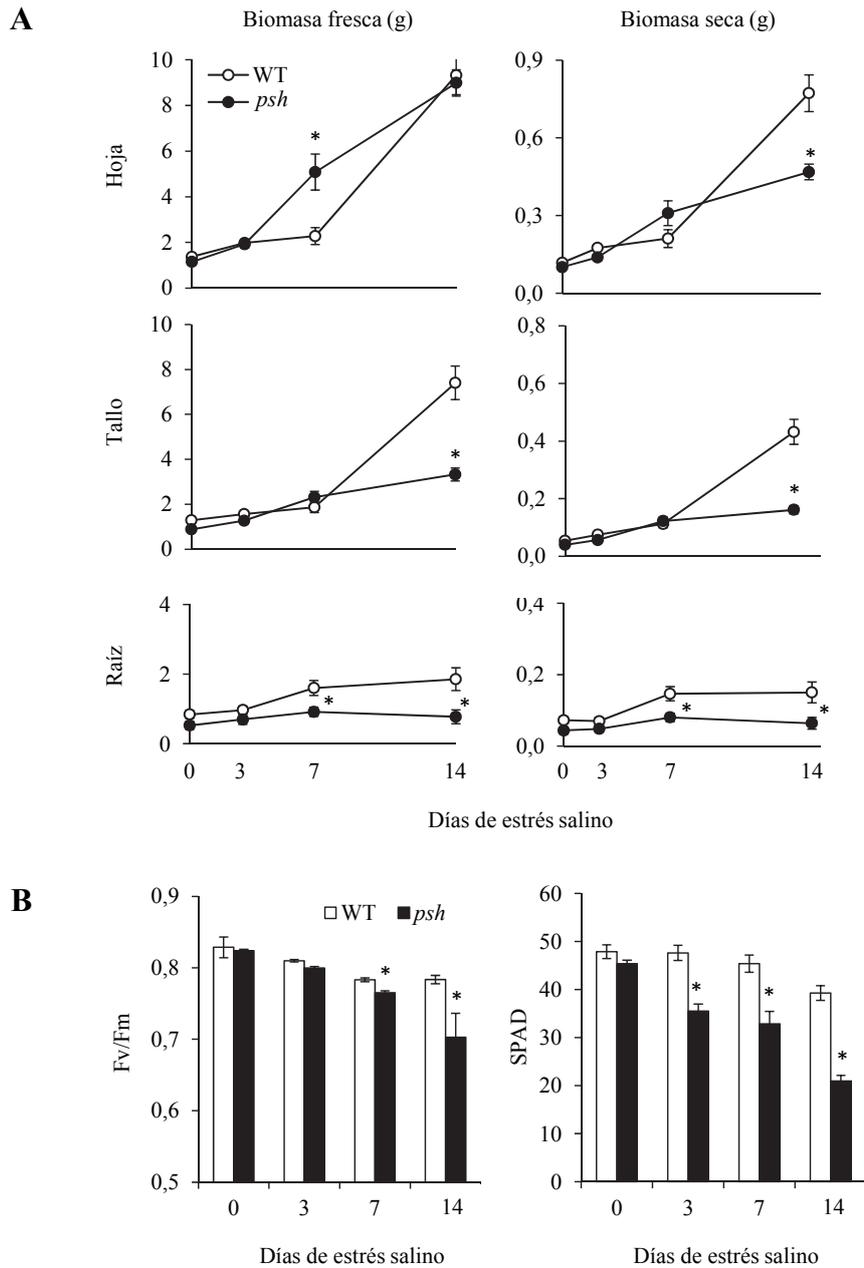


Figura 24. Evolución de biomasa, clorofila y eficiencia fotoquímica de WT y *psh*. **(A)** Contenido total de biomasa en hoja, tallo y raíz a lo largo del tratamiento salino (14 días, 100 mM NaCl), obtenido de un conjunto de plantas WT y *psh* agrupadas y expresado como contenido fresco (izquierda) o seco (derecha). **(B)** Evolución del contenido de clorofila (SPAD) y la eficiencia fotoquímica del fotosistema II (Fv/Fm) medida en hojas de plantas WT y *psh* a lo largo del estrés salino. Los datos representan el valor medio \pm error estándar de tres réplicas biológicas (n=9). Los asteriscos indican la existencia de diferencias significativas entre genotipos para cada tiempo de tratamiento, determinadas por el test *t* de Student ($P < 0,05$).

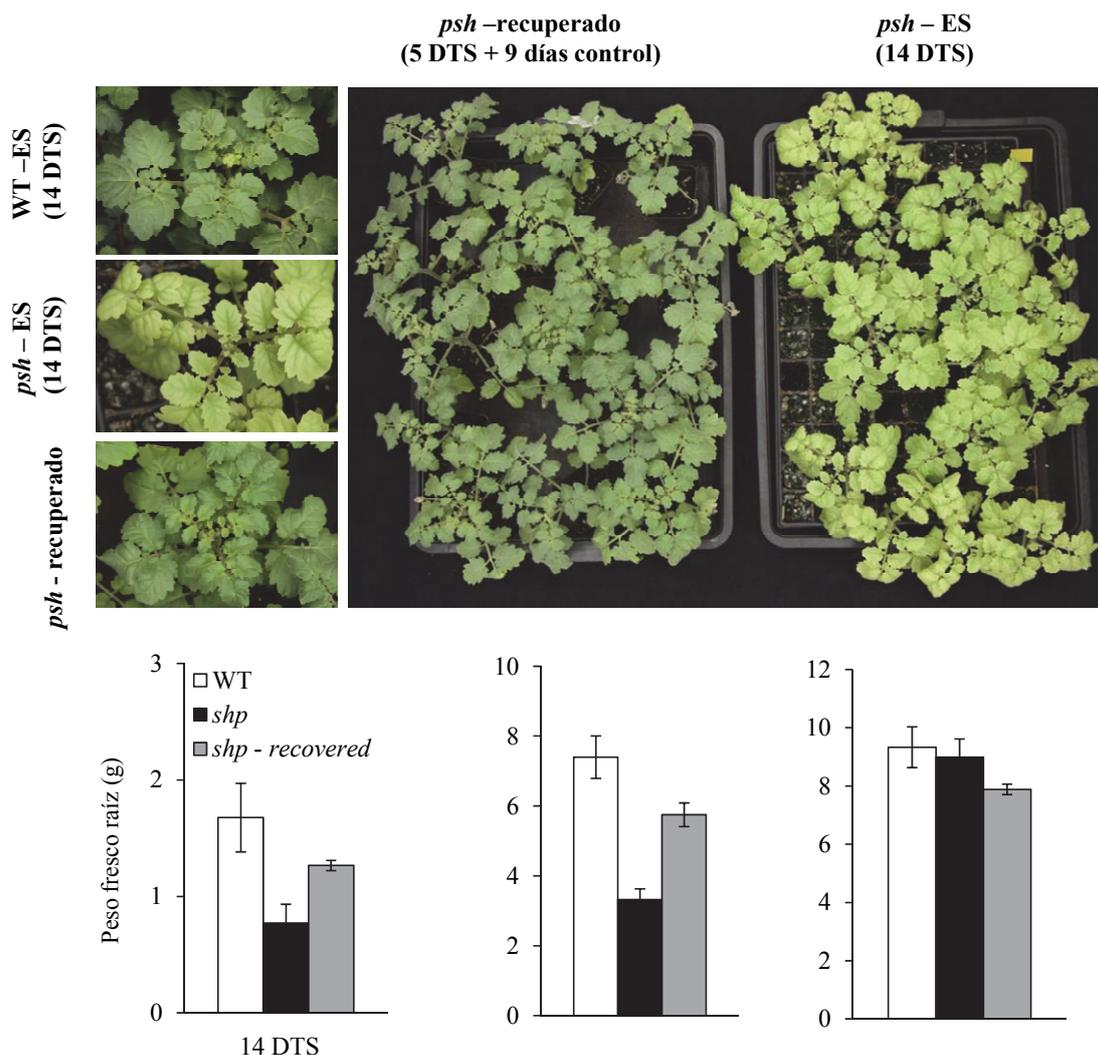


Figura 25. Recuperación del fenotipo WT observada en plantas del mutante *psh* tras interrumpir el estrés salino (ES). Las plantas de *psh* fueron sometidas a 5 días de tratamiento salino (DTS) de 100 mM NaCl y a continuación fueron regadas con solución control durante 9 días adicionales, mientras que las plantas WT y otro grupo de plantas *psh* fueron sometidas al tratamiento salino durante 14 días. Al final del tratamiento se determinó el peso fresco de cada tejido. Los datos representan el valor medio \pm error estándar de tres réplicas biológicas ($n=9$). Los asteriscos indican la existencia de diferencias significativas entre WT y *psh* para cada tratamiento, determinadas por el test *t* de Student ($P < 0,05$).

Con el fin de profundizar en la caracterización de las diferencias fenotípicas observadas entre las hojas de plantas de WT y *psh*, se llevó a cabo el estudio de la estructura celular mediante distintos análisis de microscopía. En primer lugar, no se detectaron diferencias anatómicas entre ambos genotipos en control, y las plantas presentaron valores muy similares en cuanto a grosor foliar y tamaño de las células del parénquima en empalizada y esponjoso (Figura 26). No obstante, la salinidad provocó un aumento notablemente superior del grosor foliar y el tamaño celular en el mutante, observándose

hinchazón celular y prácticamente la ausencia de espacios intercelulares respecto a las hojas de WT. Además, mientras que no se detectaron anomalías en la estructura de los cloroplastos de las plantas WT en estrés salino, en el mutante se observó un número menor de cloroplastos, de menor tamaño y con grandes inclusiones de almidón (Figura 26A).

También se analizó la anatomía de los estomas en ambos genotipos, determinando la densidad estomática, el índice estomático y la apertura estomática. En control, se observó una densidad estomática menor en la cara abaxial de las hojas del mutante respecto a las de WT, la cual se debió a un menor número de poros estomáticos en el mutante, puesto que el índice estomático también fue menor, reflejando el tamaño similar de las células epidérmicas entre ambos genotipos. La tendencia fue la misma en la cara adaxial, pero las diferencias no fueron significativas (Figura 27A).

Por otro lado, el estrés salino causó una disminución significativa de la densidad estomática en ambos genotipos, tanto en la cara adaxial como abaxial. No obstante, el índice estomático disminuyó en las hojas de WT pero no en las del mutante, indicando que la reducción de la densidad estomática en WT sí estaba relacionada con un menor número de poros estomáticos, mientras que en el mutante se debió al efecto de la expansión de las células epidérmicas (Figura 27A-B). Por último, no se detectaron diferencias significativas en la apertura estomática entre WT y *psh* en control, mientras que en estrés salino ésta fue aproximadamente 2 veces superior en el mutante que en WT, tanto en la cara adaxial como en la abaxial (Figura 27A-B).

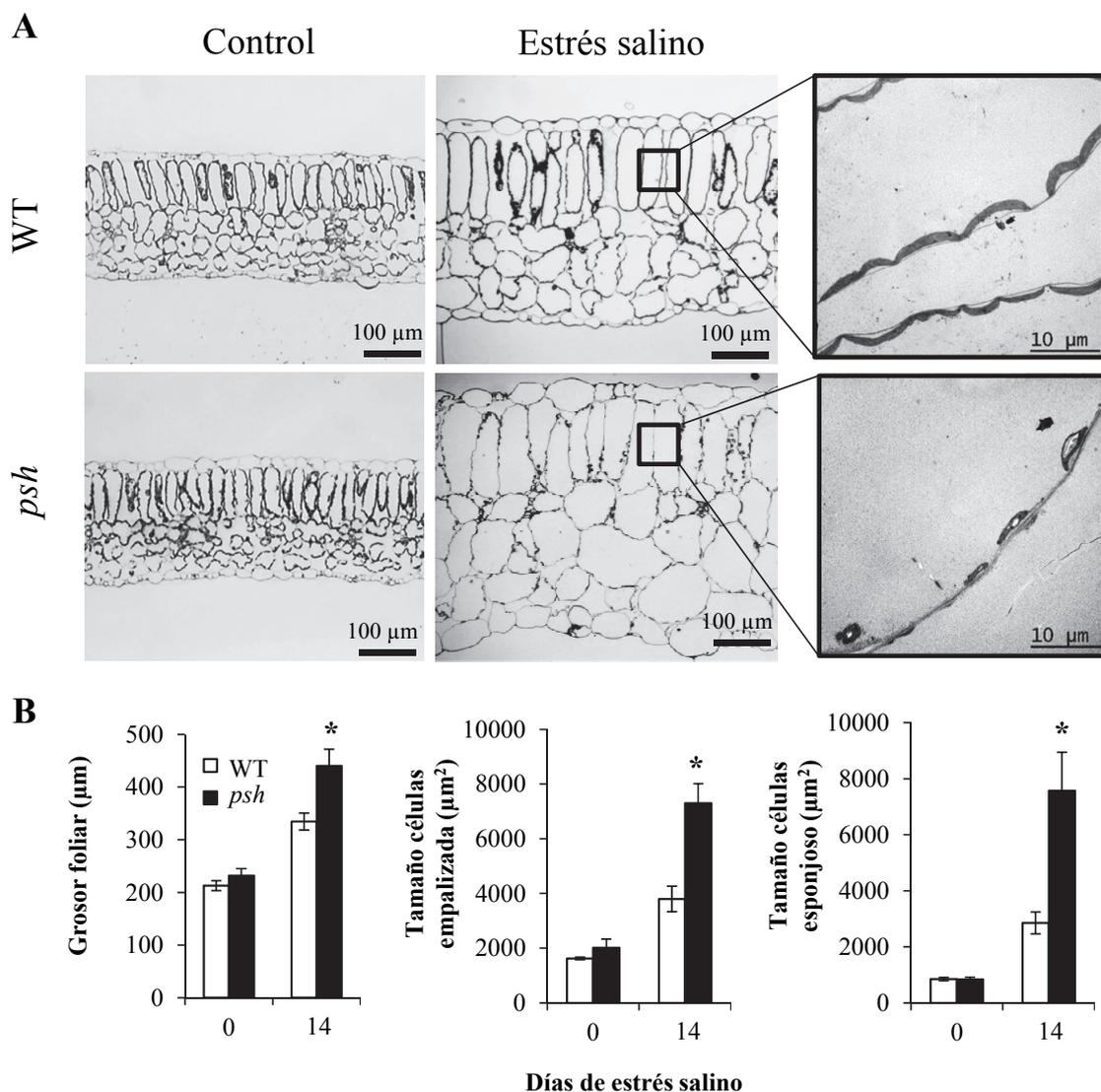


Figura 26. Características anatómicas de las células del mesófilo foliar de plantas WT y mutante *psh*. **(A)** Imágenes de microscopía óptica de secciones transversales de la hoja de WT y *psh* en ausencia de estrés (control) y tras 14 días de estrés salino (DTS, 100 mM NaCl). En la columna de la derecha se muestran imágenes de microscopía electrónica de transmisión donde se observan detalles de células del parénquima en empalizada en ambos genotipos. **(B)** Datos de grosor foliar, tamaño de las células del parénquima en empalizada y esponjoso de plantas WT y *psh* en control y tras 14 DTS. Los datos representan el valor medio \pm error estándar de tres réplicas biológicas (n=9). Los asteriscos indican la existencia de diferencias significativas entre genotipos para cada tratamiento, determinadas por el test *t* de Student ($P < 0,05$).

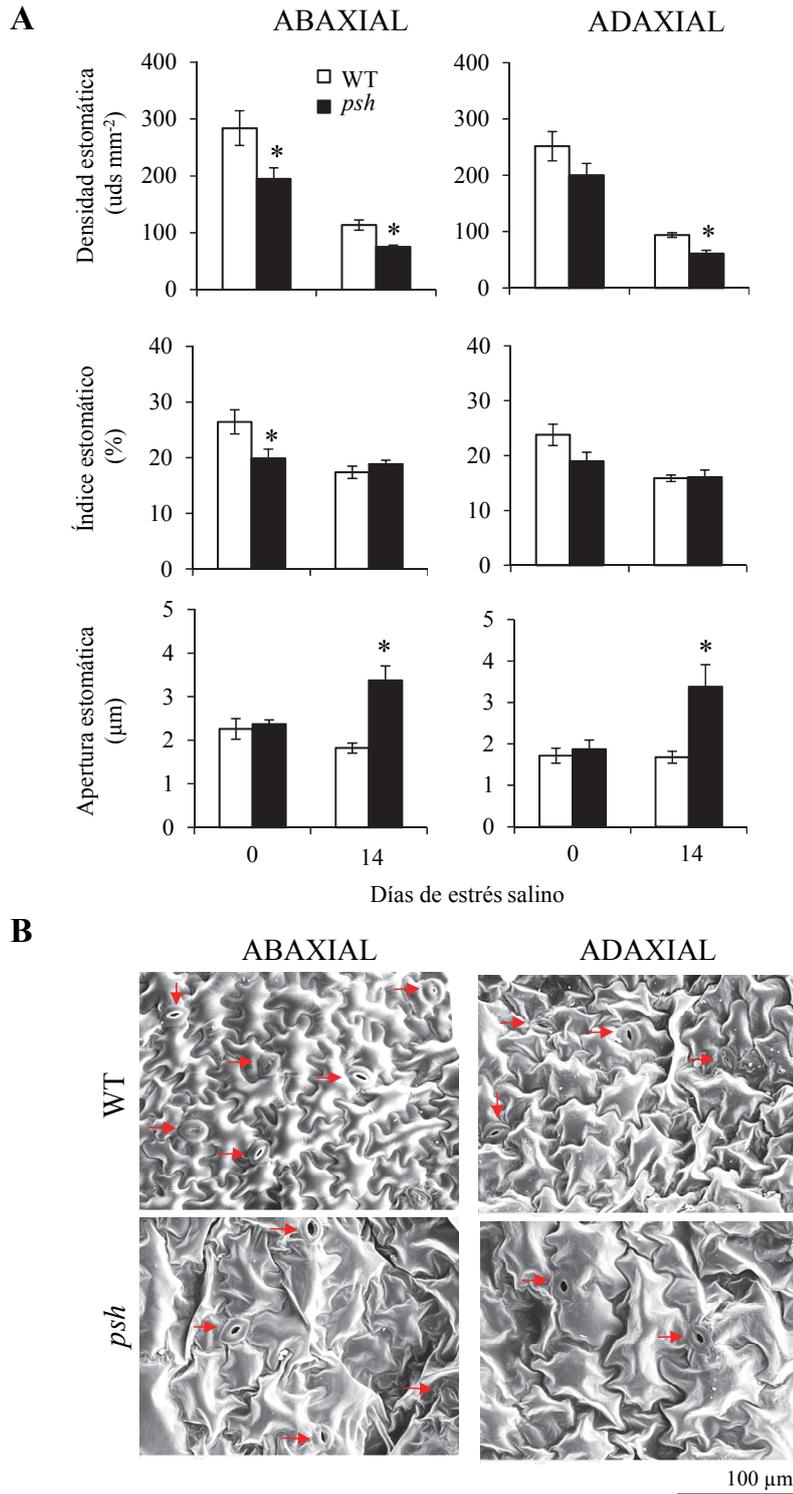


Figura 27. Densidad y apertura estomática en hojas de plantas de *S. pennellii* (WT) y del mutante *psh*. **(A)** Densidad estomática, índice estomático y apertura estomática en la superficie adaxial y abaxial de la hoja de plantas WT y *psh* en control y estrés salino (14 días, 100 mM NaCl). Los datos representan el valor medio \pm error estándar de tres réplicas biológicas (n=9). Los asteriscos indican la existencia de diferencias significativas entre genotipos para cada tratamiento, determinadas por el test *t* de Student ($P < 0,05$). **(B)** Imágenes de microscopía electrónica de barrido de secciones de la hoja de WT y *psh* donde se muestran las células epidérmicas y los estomas (señalados con flechas rojas) en estrés salino.

3.3.2. Evolución del contenido de agua e iones en raíz, tallo y hojas de *S. pennellii* y *psh* en estrés salino.

Se observaron diferencias notables en la acumulación de agua e iones salinos entre WT y *psh*, especialmente en la parte aérea, y más concretamente en las hojas (Figura 28). En raíz, no se observaron diferencias en el contenido de agua, ni en control ni a lo largo del tratamiento salino, mientras que las diferencias en la concentración de Na^+ y Cl^- solo fueron significativas al final del tratamiento (14 DTS). Por otro lado, en el tallo se detectó un mayor contenido de agua en el mutante a partir de 7 DTS y en adelante, y la misma tendencia se obtuvo para el Cl^- . Sin embargo, la acumulación de Na^+ en el tallo de *psh* fue superior incluso desde antes de la aplicación del tratamiento salino, y las diferencias se incrementaron a lo largo del estrés hasta llegar a ser un 60% superior en el mutante. Las diferencias más destacables se dieron en las hojas (Figura 28), donde el mutante acumuló un mayor contenido de Na^+ que WT tan solo un día después del inicio del estrés, llegando a alcanzar el doble de Na^+ que WT al final del tratamiento salino. Las diferencias entre WT y *psh* en el contenido de agua en hojas también fueron muy significativas y superiores a las observadas en el tallo. Asimismo, se observaron diferencias importantes en la acumulación de Cl^- , aunque en ambos genotipos la magnitud fue inferior a la de Na^+ .

La translocación neta de agua y de los iones salinos Na^+ y Cl^- muestra claramente las importantes diferencias entre la velocidad de transporte de WT y *psh* (Figura 28). En el mutante, la velocidad de transporte de agua y Na^+ fue superior entre 0-7 DTS y disminuyó entre 7-14 DTS. Por el contrario, en WT se observó un transporte inferior y más estable durante los primeros 7 DTS, y aumentó posteriormente entre 7-14 DTS. Los datos obtenidos para Cl^- corroboran la menor magnitud de la acumulación de este anión, ya que la velocidad de translocación se estabilizó en *psh* tras 3 DTS, y no se observaron diferencias entre WT y *psh* al final del tratamiento.

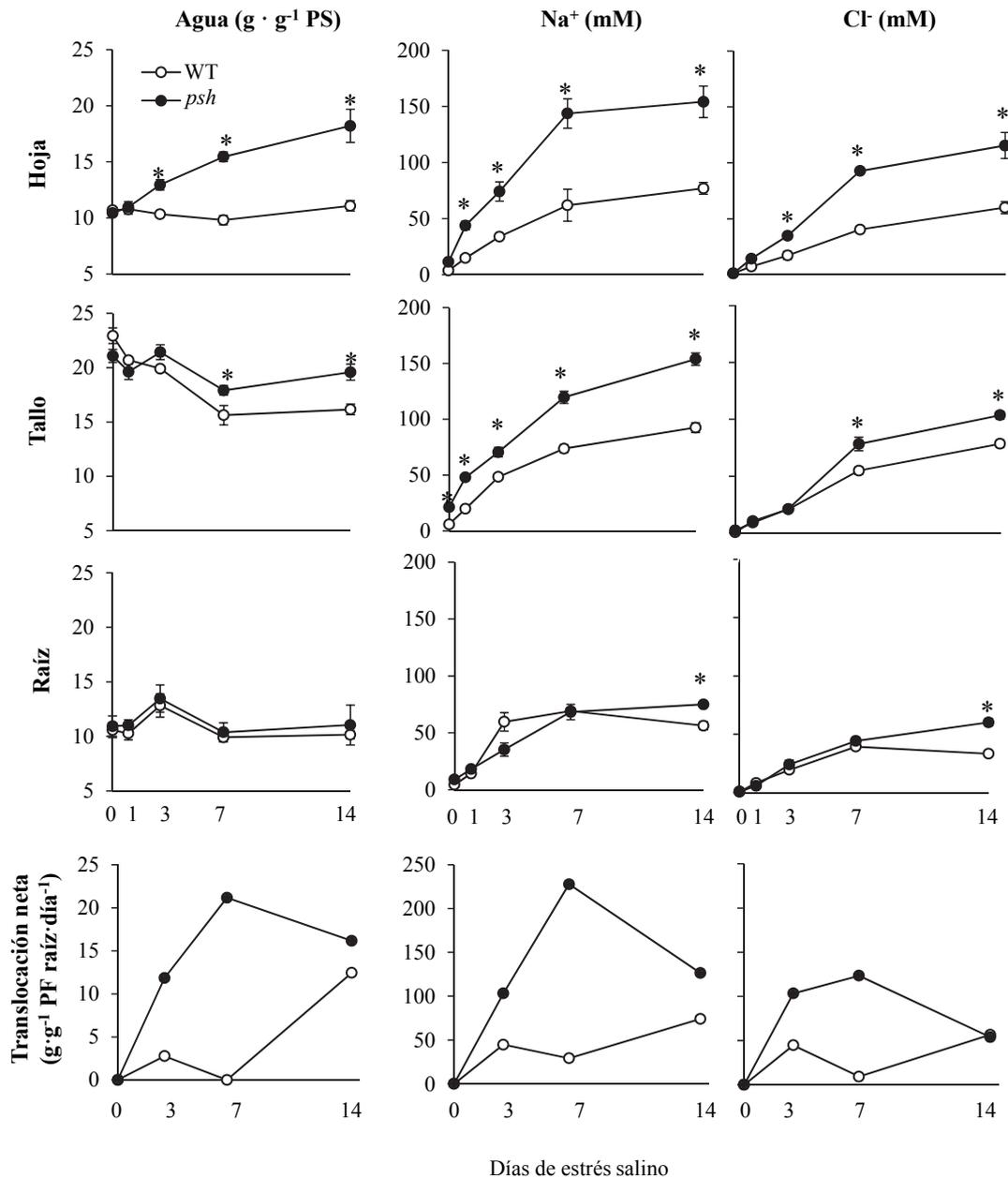


Figura 28. Evolución del contenido de agua, Na⁺ y Cl⁻ en raíz, tallo y hoja de plantas WT y *psh* a lo largo del tratamiento salino (14 días 100 mM NaCl), así como velocidad de transporte de los mismos a la parte aérea (translocación neta). Los datos representan el valor medio ± error estándar de tres réplicas biológicas (n=9). Los asteriscos indican la existencia de diferencias significativas entre genotipos para cada tratamiento, determinadas por el test *t* de Student ($P < 0,05$). PS = Peso seco; PF = Peso fresco.

Por otra parte, se observó un contenido de K⁺ menor en la parte aérea de *psh* respecto a WT en control, y las diferencias se incrementaron en estrés salino, especialmente en el tallo (Figura 29). La relación Na⁺/K⁺ fue significativamente mayor en el mutante que en

WT en la parte aérea, especialmente en las hojas, tan solo tres días después del inicio del tratamiento salino.

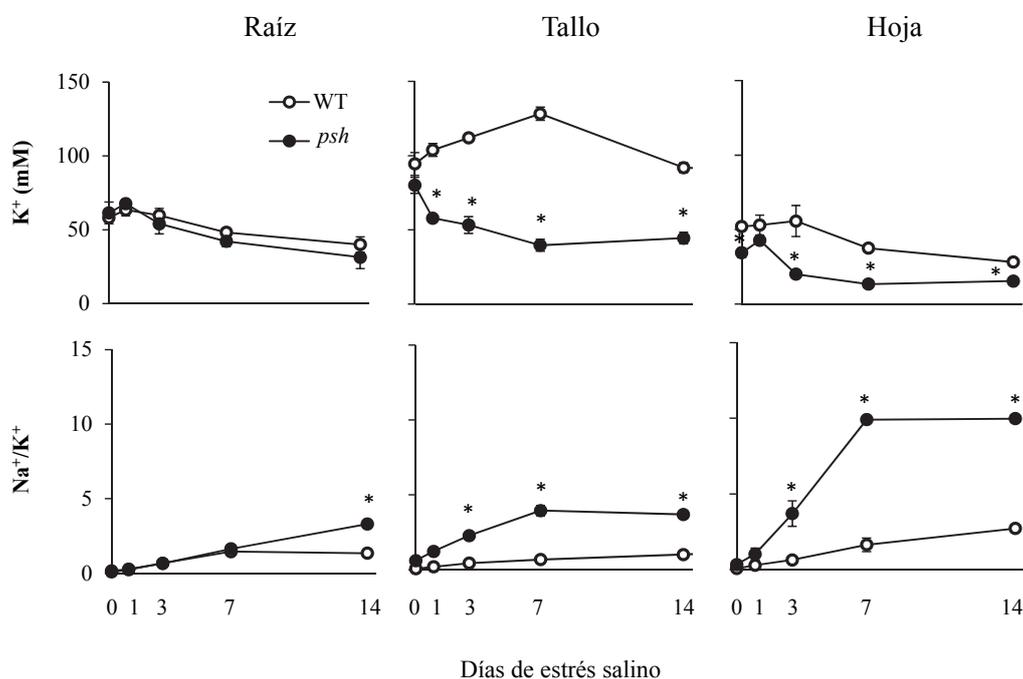


Figura 29. Evolución del contenido de K^+ en raíz, tallo y hoja de plantas WT y *psh* a lo largo del tratamiento salino (14 días 100 mM NaCl), así como la relación Na^+/K^+ obtenida en cada tejido. Los datos representan el valor medio \pm error estándar de tres réplicas biológicas (n=9). Los asteriscos indican la existencia de diferencias significativas entre genotipos para cada tratamiento, determinadas por el test *t* de Student ($P < 0,05$).

3.3.3. Análisis de expresión de genes implicados en el transporte de agua y de los iones Na^+ y K^+ .

Con el fin de estudiar si el elevado transporte de agua a la parte aérea observado en el mutante en estrés salino estaba relacionado con diferencias de expresión de genes involucrados en el transporte de agua, también se analizó la expresión de dos acuaporinas previamente caracterizadas en tomate, *PIP2;1* y *TIP2;2* (Sade *et al.*, 2009; Byrt *et al.*, 2016). En cuanto a *TIP2;2*, se observó una mayor expresión basal en la parte aérea de *psh*, especialmente en las hojas, aunque las diferencias se fueron reduciendo progresivamente hasta igualar el nivel de expresión en ambos genotipos tras 3 DTS (Figura 30). Por otro lado, *PIP2;1* mostró un perfil muy distinto en *psh* y WT, de manera que en ausencia de estrés se observó una mayor expresión en la raíz del mutante que en WT, y lo opuesto en tallo y hoja. Además, en estrés salino la expresión de

PIP2;1 disminuyó progresivamente en la raíz del mutante, aunque siguió siendo superior a la de WT tras 3 DTS. Sin embargo, ocurrió lo contrario en la parte aérea, de tal forma que la expresión de *PIP2;1* aumentó en el mutante a lo largo del tratamiento salino. Así, la expresión de *PIP2;1* en hojas del mutante tras 3 DTS fue casi 5 veces superior a la de WT (Figura 30).

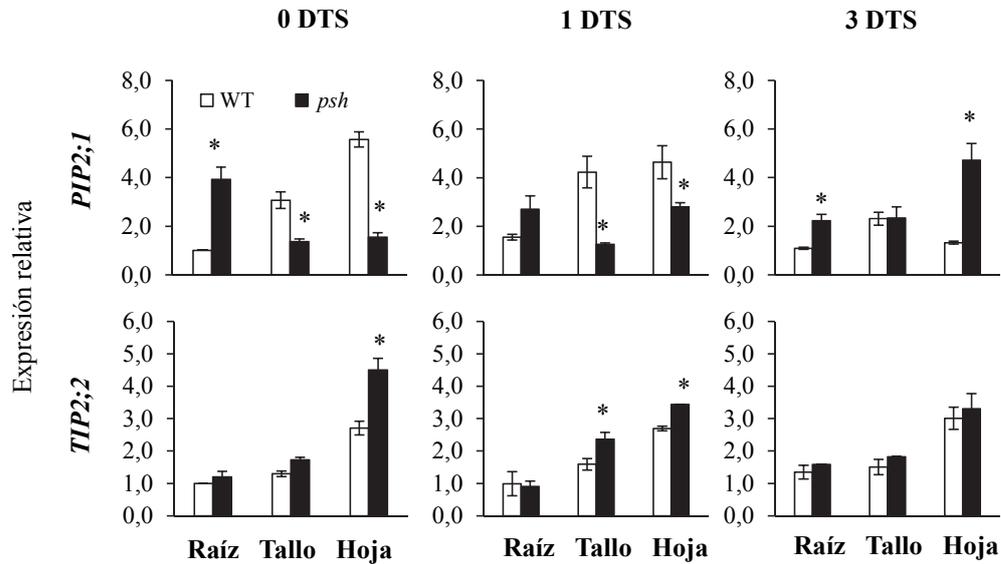


Figura 30. Análisis por RT-qPCR de genes implicados en el transporte de agua en raíz, tallo y hoja de plantas WT y *psh*. Evolución de la expresión relativa de *PIP2;1* y *TIP2;2* en ausencia de estrés (día 0) y tras 1 y 3 días de tratamiento salino (DTS, 100 mM NaCl). El valor de expresión de cada gen se relativizó al obtenido en la raíz de WT a día 0. Los datos representan el valor medio \pm error estándar de tres réplicas biológicas (n=9). Los asteriscos indican la existencia de diferencias significativas entre genotipos para cada tejido y tratamiento, determinadas por el test *t* de Student ($P < 0,05$).

Respecto a Na^+ , la alta velocidad de transporte hasta las hojas de *psh* podría estar relacionada con una alteración de la expresión de genes implicados en la homeostasis de Na^+ . Para evaluar esta hipótesis, se analizó en plantas WT y *psh* la expresión de los dos genes principales implicados en este proceso, *SOS1* y *HKT1;2*, a 0, 1 y 3 DTS (100 mM NaCl) (Figura 31). No se observaron diferencias de expresión significativas en ninguno de los tejidos analizados ni en control ni en estrés salino para *SOS1* pero si para *HKT1;2*. En raíz, la expresión de *HKT1;2* estaba anulada en el mutante en ausencia de estrés, pero se observó una inducción progresiva del gen con la sal hasta alcanzar un nivel de expresión superior al de la raíz de WT tras 3 DTS. Sin embargo, la expresión de *HKT1;2* siempre fue menor en el tallo y las hojas de *psh*, respecto a WT, tanto en control como a lo largo del tratamiento salino. Adicionalmente, se analizó la expresión

de *NHX3* y *NHX4*, involucrados en la acumulación de Na^+ en vacuolas (Figura 31). Nuestros resultados indicaron que *NHX4* se expresa en la parte aérea, especialmente en hojas, y aunque se observó una tendencia a que el mutante presentara mayor expresión que WT, tanto en control como en estrés salino, las diferencias solo fueron significativas tras 1 DTS. En cuanto a *NHX3*, su expresión se detectó en todos los tejidos analizados, y no se observaron diferencias significativas entre el mutante y WT ni a nivel basal ni después de 1 DTS. No obstante, la expresión de *NHX3* fue significativamente superior en las hojas de *psh* respecto a WT tras 3 DTS.

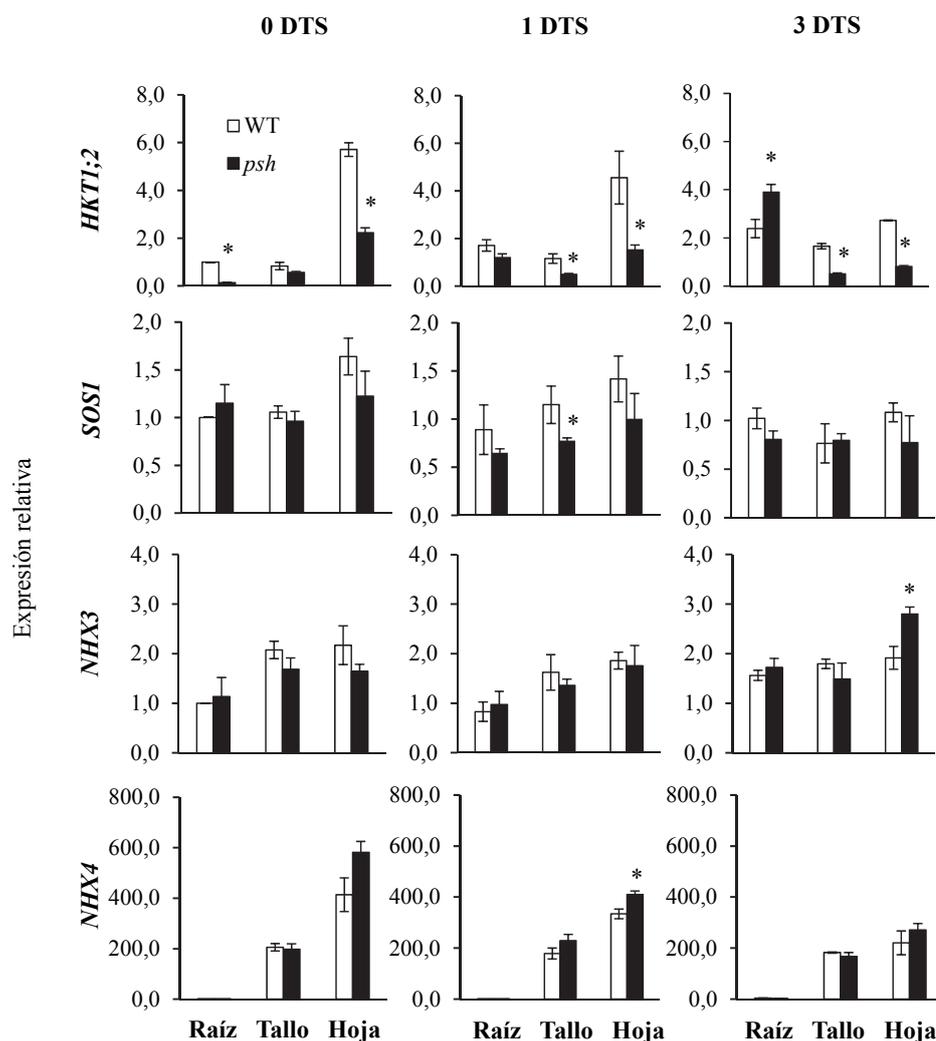


Figura 31. Análisis por RT-qPCR de los principales genes implicados en la homeostasis de Na^+ en raíz, tallo y hoja de plantas WT y *psh*. Evolución de la expresión relativa de *HKTI;2*, *SOS1*, *NHX3* y *NHX4* en ausencia de estrés (día 0) y tras 1 y 3 días de tratamiento salino (DTS, 100 mM NaCl). El valor de expresión de cada gen se relativizó al obtenido en la raíz de WT a día 0. Los datos representan el valor medio \pm error estándar de tres réplicas biológicas (n=9). Los asteriscos indican la existencia de diferencias significativas entre genotipos para cada tejido y tratamiento, determinadas por el test *t* de Student ($P < 0,05$).

Finalmente, se analizó la expresión del gen *SKOR*, que codifica un canal de K^+ de la familia *Shaker*, cuyo homólogo en *Arabidopsis* está implicado en la carga de K^+ al xilema (Véry y Sentenac, 2003) (Figura 32). Así, se detectó su expresión en raíz y en menor medida en hoja, pero no en tallo. En raíz, se observó una expresión menor en el mutante respecto a WT únicamente tras 1 DTS, mientras que en hoja el mutante partió de una expresión menor en control y las diferencias se fueron incrementando progresivamente tras 1 y 3 DTS.

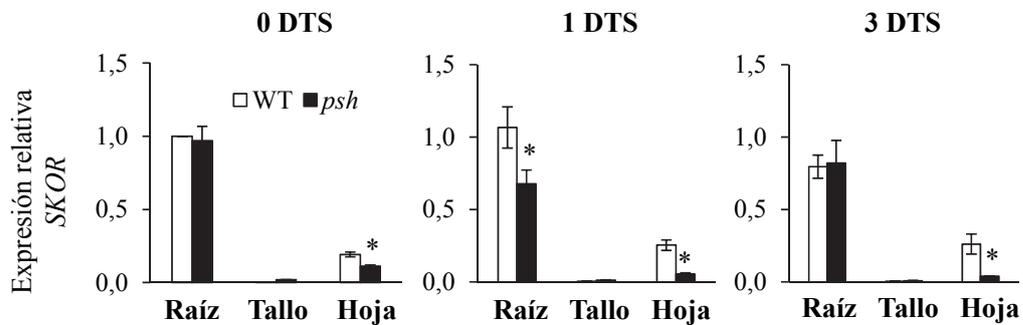


Figura 32. Análisis por RT-qPCR del principal gen implicado en la transporte de K^+ a larga distancia, *SKOR*, en ausencia de estrés (día 0) y tras 1 y 3 días de tratamiento salino (DTS, 100 mM NaCl). El valor de expresión se relativizó al obtenido en la raíz de WT a día 0. Los datos representan el valor medio \pm error estándar de tres réplicas biológicas (n=9). Los asteriscos indican la existencia de diferencias significativas entre genotipos para cada tejido y tratamiento, determinadas por el test *t* de Student ($P < 0,05$).

4. DISCUSIÓN

La tolerancia de las plantas al estrés osmótico inducido por sequía y salinidad es la suma de dos procesos: La capacidad de la planta para absorber agua por las raíces, lo cual se asocia generalmente a un importante desarrollo radicular, y la capacidad de la planta para evitar una excesiva deshidratación de las hojas, siendo difícil separar los aspectos beneficiosos de cada uno de ellos. Para avanzar en el conocimiento de las bases moleculares de la tolerancia osmótica sería interesante identificar tanto los genes clave de raíz como los de hoja, pero la principal estrategia utilizada hasta ahora ha sido centrarse en los procesos de raíz para incrementar la absorción de agua (Yamaguchi *et al.*, 2010; Slovak *et al.*, 2016). En este sentido, *S. pennellii* puede servir como modelo para identificar genes clave de tolerancia a estrés hídrico en la parte aérea, como el desarrollo de su raíz es muy pobre y, consecuentemente, su alto grado de tolerancia a la sequía debe ser una consecuencia de los procesos moleculares generados en las hojas después del estrés o bien de los niveles constitutivos ya existentes en la especie. Pero además es un excelente modelo para avanzar en los mecanismos de tolerancia al estrés iónico inducido por la salinidad, como reflejan los resultados previos obtenidos por nuestro grupo de investigación en esta especie (Alarcon *et al.*, 1993; Santa-Cruz *et al.*, 1999). Todo ello justifica el interés de estudiar la respuesta fenotípica, fisiológica y molecular de la especie silvestre a los estreses hídrico y salino, así como avanzar en la caracterización del mutante de *S. pennellii* con alta sensibilidad al estrés salino.

4.1. La tolerancia de la especie silvestre *S. pennellii* a la deshidratación está asociada tanto a diferencias de expresión constitutivas como a genes específicamente inducidos por el estrés

Las diferencias en los mecanismos de tolerancia entre las especies silvestres y las cultivadas pueden estar relacionadas con diferencias en el nivel basal de expresión de genes implicados en diferentes procesos metabólicos (Escobar-Bravo *et al.*, 2016). En nuestro estudio, genes implicados en la ruta del acetil-CoA, síntesis de ácidos grasos e isoprenoides, y también algunos relacionados con el metabolismo del *mio*-inositol y la fotorrespiración, estaban constitutivamente inhibidos en *Sp* respecto a *Sl*, y estas diferencias se mantuvieron en condiciones de estrés hídrico (Figura 12). La menor expresión de estos genes en *Sp* podría reflejar simplemente un mayor requerimiento de compuestos lipídicos y carbohidratos en la especie cultivada, pero también podría

indicar una mayor eficiencia metabólica de la especie silvestre, cuyo hábitat natural se caracteriza por condiciones ambientales de estrés. En este sentido, también cabe mencionar la inhibición específica en *Sp* de genes relacionados con la fotorrespiración, *GOX* y *GLRY2*. Durante la fotorrespiración, la mayor cantidad de H₂O₂ se genera en el peroxisoma mediante la oxidación de glicolato a glioxilato, catalizada por *GOX*, y dicha reacción debe ser estrictamente controlada para mantener la homeostasis redox (Miller *et al.*, 2010). La menor expresión de *GOX* en *Sp* sugiere que la especie silvestre es capaz de reducir la acumulación de H₂O₂ y glioxilato. Esta hipótesis se apoya también en la inhibición constitutiva en *Sp* de *GLYR2*, cuyo producto génico cataliza la reacción de detoxificación de glioxilato (Figura 12).

Respecto a los genes inducidos específicamente por el estrés en *S. pennellii*, hay un importante número de genes implicados en el metabolismo del nitrógeno. A pesar de que el mantenimiento del balance C/N es crucial para el crecimiento de la planta y debe ser estrictamente regulado en condiciones de estrés (Rabara *et al.*, 2015), hasta ahora apenas existía información sobre la regulación de los genes implicados en el metabolismo del N en *Sp* durante el estrés hídrico. Es interesante señalar que, en nuestro estudio transcriptómico, se observó la inducción específica en sequía de dos genes implicados en el metabolismo del nitrógeno en las hojas de *Sp* (Figura 13), como *GDH2* y *ASNI*, que participan en la síntesis de Glu y Asn, respectivamente. La producción de Asn es la vía principal para el transporte y almacenamiento de N en plantas superiores, debido a que este aminoácido posee una alta relación N/C y es muy estable (Cho *et al.*, 2007). Además, algunos estudios han determinado que ASN juega un papel importante en la respuesta a diversos estreses (Rabara *et al.*, 2015; Gaufichon *et al.*, 2010). En nuestro estudio, además de la sobreexpresión de *ASNI* en las hojas de *Sp*, se detectó la inhibición de *Asparaginasa 2*, cuyo producto génico interviene en la reacción contraria, degradando Asn, contribuyendo así a la acumulación de este aminoácido.

También se observó en *Sp* la activación del ciclo GS/GOGAT y de la ruta derivada del GABA (*GABA-shunt*), la cual favorece la conversión de Glu a succinato para su reincorporación en el ciclo de los ácidos tricarbónicos (TCA). Concretamente, se detectó la inducción de los genes *GLT1*, *GAD1* y *GABA-T* específicamente en sequía en *Sp*, indicando que el mantenimiento del balance C/N en condiciones de estrés hídrico es un factor importante en la tolerancia de la especie silvestre. Michaeli *et al.* (2011) confirmaron la importancia del GABA como precursor de múltiples rutas metabólicas,

incluyendo el ciclo TCA y el metabolismo de las poliaminas. En este sentido, estudios previos en estrés salino señalaron que una diferencia fundamental entre *Sp* y *Sl* era la mayor acumulación de putrescina en la especie silvestre en fases tempranas del estrés, la cual estaba relacionada con diferencias en el contenido de aminoácidos relacionados con su síntesis, como Glu, entre ambas especies (Santa-Cruz *et al.*, 1999). Aunque existen algunos estudios que demuestran una relación entre el GABA-*shunt* y la respuesta a estreses abióticos (Krasensky *et al.*, 2012), apenas existe información acerca de los mecanismos moleculares que determinan el papel de esta ruta en la tolerancia de *Sp* a la sequía. Es interesante señalar un estudio reciente realizado en tomate, en el que la tolerancia a estrés hídrico inducida por la aplicación de paclobutrazol se vio acompañada por un incremento de la expresión de genes implicados en el ciclo TCA y el GABA-*shunt* (Pal *et al.*, 2016). En resumen, la tolerancia a sequía de *Sp* parece estar relacionada con un mayor abastecimiento del ciclo TCA a través de la activación del GABA-*shunt*. Finalmente, cabe mencionar que algunos estudios han correlacionado una mayor asimilación de N con una mejora del estado hídrico de la planta a través de la reducción de E y g_s (Robredo *et al.*, 2011; Zaghdoud *et al.*, 2016), como se observó en *Sp* en condiciones de estrés hídrico (Figura 9D, E).

Las hormonas vegetales controlan y conectan cascadas de señalización complejas que regulan la adaptación a condiciones de estrés (Golldack *et al.*, 2014). Entre ellas, JA está considerado un regulador clave de la expresión de genes de respuesta a estrés en la mayoría de las especies vegetales (Wasternack y Hause, 2013; Wasternack, 2014; Kazan, 2015). Curiosamente, se detectó la activación constitutiva de genes implicados en la biosíntesis de JA, como *LOX3*, *AOS* y *OPR2*, en *Sp* respecto a *Sl*, y esta tendencia se mantuvo en condiciones de sequía (Figura 14). Otra hormona implicada en la respuesta a estrés abiótico es el ET (Zhu *et al.*, 2016), y varios genes implicados en la biosíntesis y señalización de ET, concretamente las etapas catalizadas por ACO y reguladas por ERFs, se indujeron en las hojas de *Sp* en estrés hídrico (Figura 14). Phukan *et al.* (2017) señalaron que los ERFs regulan la expresión de una gran variedad de genes relacionados con procesos de estrés y desarrollo a través de distintos mecanismos, y en nuestro análisis microarray los genes *ERF1B* y *ERF095* estaban inducidos en sequía en *Sp*. Aunque apenas se conoce el papel de los ERFs en la regulación de las rutas de señalización hormonal en condiciones de sequía (Joshi *et al.*, 2016), se ha sugerido que la inducción de *ERF1* requiere una señal de ET y también de

JA bajo diferentes condiciones de estrés abiótico (Lorenzo *et al.*, 2003; Cheng *et al.*, 2013). Además, se ha demostrado que la señalización de ET/JA también es necesaria para la inducción de otros *ERFs* en respuesta a estreses abióticos, como observamos en *ERF095* (Figura 14). En cuanto al estrés oxidativo, se ha relacionado la sobreexpresión de *LeERF1* y *LeERF2* con una reducción del contenido de MDA en plantas de tomate sometidas a estrés salino (Hu *et al.*, 2014). Nuestros resultados están de acuerdo con los obtenidos en dicho estudio, ya que el contenido de MDA en las hojas de *Sp* fue inferior al de *Sl* en condiciones de sequía (Figura 9C). Por otra parte, se ha sugerido que el mecanismo de acción de *ERF1* para activar genes de estrés es la interacción con sus elementos DRE, entre ellos los genes de respuesta a la deshidratación *RD20* y *RD29B* (Cheng *et al.*, 2013). En nuestro microarray, detectamos la inducción del gen *RD19A* en *Sp* respecto a *Sl*, aunque de forma constitutiva (Figura 12). En conjunto, estos resultados sugieren que la inducción de genes implicados en el metabolismo/señalización de JA y ET en *Sp* está relacionada con su tolerancia a la sequía. Por otro lado, se ha determinado que la señalización de ET/JA, entre otras hormonas vegetales, regula el balance entre desarrollo y tolerancia al estrés (Achard *et al.*, 2003; Achard *et al.*, 2006; Yang *et al.*, 2012). Un aspecto de esta regulación ocurre mediante la interacción con el metabolismo del N, como observaron Zhang *et al.* (2014) en la raíz de *Arabidopsis*. Los resultados obtenidos en hojas de *Sp* apuntan en la misma dirección, puesto que los genes implicados en el metabolismo de aminoácidos y el metabolismo/señalización de ET y JA fueron los principales inducidos por la sequía en la especie silvestre (Figuras 13 y 14).

4.2. El control de la pérdida de agua es un mecanismo fundamental en la tolerancia de *S. pennellii* a sequía y salinidad. Importancia de las adaptaciones anatómicas de la hoja frente al estrés

Las diferencias observadas a nivel fisiológico demuestran la capacidad de *Sp* para evitar la pérdida de agua por transpiración bajo condiciones de estrés hídrico (Figura 8B, D, E y 8A, D, E) y salino (Figuras 16 y 17B). En condiciones de sequía, se observó un mayor contenido de agua y una menor g_s y E en *Sp* respecto a *Sl*, acompañadas de una menor densidad y apertura estomática en la superficie abaxial de la hoja (Figura 9D-G). En cuanto a salinidad, también se observó una reducción de la transpiración en *Sp*, reflejada por la mayor T^a foliar en la especie silvestre respecto a *Sl* (Figura 17B). Además, se detectó una menor densidad y apertura estomática en sal respecto a control

en *Sp*, tanto en la superficie abaxial como en la adaxial de la hoja (Figura 18). Por tanto, este comportamiento en *Sp* parece ser generalizado frente al estrés osmótico causado por sequía y salinidad, y subraya la importancia del control de la densidad y apertura estomática en la adaptación de las plantas a distintas condiciones de estrés (Casson y Gray, 2008). En este sentido, la pérdida de agua por transpiración está estrechamente relacionada con las características anatómicas de la hoja (Muir *et al.*, 2014), y no ocurre solamente a través de los estomas sino también a través de la cutícula (Koenig *et al.*, 2014). Los poros cuticulares se suelen concentrar en el área que rodea a los estomas, y la transpiración a través de ellos no se puede controlar (Shabala, 2013). Por esta razón, una estrategia más eficiente para limitar la pérdida de agua por transpiración sería tener un menor número de estomas aunque estos tuvieran un mayor grado de apertura, en lugar de poseer un mayor número de estomas parcialmente abiertos. En este sentido, en algunas especies halófitas se ha observado la disminución de la densidad estomática durante el estrés salino (Orsini *et al.*, 2011; Shabala *et al.*, 2012), lo que apoya la importancia de este mecanismo para optimizar la pérdida de agua en condiciones salinas.

En relación a la pérdida de agua a través de los estomas, las anhidrasas carbónicas (CAs) son las principales reguladoras de la densidad y el movimiento de los estomas, incluido el cierre estomático (Hu *et al.*, 2010; Engineer *et al.*, 2014; Kollist *et al.*, 2014). En los tejidos fotosintéticos, la CA contribuye a la conductancia mesofílica (g_m) manteniendo el equilibrio $CO_2 - HCO_3^-$ en el citosol y los cloroplastos, y así facilitando el acceso de la Rubisco al CO_2 para su fijación (Evans *et al.*, 2009; Pérez-Martín *et al.*, 2014). Además, en un estudio reciente en álamo negro, Momayyezi y Guy (2017) indicaron que la actividad de la CA juega un papel importante en la regulación de la resistencia mesofílica a la difusión del CO_2 . En nuestro análisis transcriptómico, observamos una inducción específica en sequía del gen *CA1* en *Sp* respecto a *Sl* (Figura 14A), lo que sugiere que la especie silvestre está tratando de reducir la pérdida de agua a través del cierre estomático mediado por CA.

Otros mecanismos que determinan el control de la pérdida de agua incluyen la modificación de la pared celular (Bray, 2004; Le Gall *et al.*, 2015). En este sentido, la capacidad de *Sp* para evitar la pérdida de agua en estrés hídrico podría estar asociada con la inducción de genes implicados en la extensibilidad de la pared celular, como *XTH16* y *EXPB2*, y el engrosamiento de la pared celular, como *PARVUS/GLZ1* (Figura

14A). Otro factor a tener en cuenta es el grosor de la hoja, el cual está positivamente relacionado con la succulencia y puede prevenir la deshidratación celular (Ogburn y Edwards, 2010). Así, observamos que *Sp* presenta un mayor grosor foliar respecto a *Sl* de forma constitutiva, lo que podría favorecer la evitación de la pérdida de agua en la especie silvestre (Figura 20A, B).

Las alteraciones de la densidad/apertura estomática y de las propiedades de pared celular como estrategias para reducir la pérdida de agua transpiracional deben alcanzar un equilibrio ya que conllevan una reducción de la absorción de CO₂, afectando al crecimiento de la planta (Luan, 2002; Shabala *et al.*, 2013). En un estudio reciente, Onoda *et al.* (2017) indicaron que una mayor proporción de biomasa en la pared celular de las células de la hoja (y por tanto mayor grosor) estaba relacionada con una menor inversión de nitrógeno foliar en proteínas fotosintéticas y con menores tasas de difusión de CO₂ dentro de la hoja. Sin embargo, la especie silvestre *Sp* parece capaz de alcanzar un balance entre la pérdida de agua y el mantenimiento del desarrollo (Figura 15A). Una posible estrategia que puede explicar la existencia de este balance es la diferente distribución estomática observada entre *Sp* y *Sl* en ausencia de estrés, de manera que en la especie silvestre los estomas están equitativamente distribuidos en ambas superficies de la hoja, mientras que en la especie cultivada la proporción es superior en la superficie abaxial respecto a la adaxial (Figuras 9F y 18). Así, la mayor densidad estomática adaxial en *Sp* podría favorecer una difusión de CO₂ más eficiente en sus hojas de mayor grosor (Nakazato *et al.*, 2010). El cierre estomático también puede alterar la homeostasis redox (Miller *et al.*, 2010). Sin embargo, *Sp* sufrió un menor grado de estrés oxidativo de acuerdo a su menor contenido en MDA en condiciones de estrés hídrico respecto a *Sl* (Figura 9C). Además, se observó la inducción constitutiva del gen *APX2* en *Sp* respecto a *Sl*, favoreciendo el mantenimiento de la homeostasis redox en la especie silvestre (Figura 12). Por otro lado, el esperable agotamiento del C como consecuencia del cierre estomático no parece ocurrir en *Sp* sino más bien al contrario, de acuerdo con la inducción del gen *FINSI*, implicado en la síntesis de Fru-6-P, y la inhibición del gen *ADGI*, implicado en la síntesis de almidón (Figura 13), lo que sugiere que *Sp* previene la utilización del carbono para la síntesis de almidón, y así consigue movilizar azúcares.

En nuestro estudio comparativo en estrés salino, también se detectaron importantes diferencias en las células del mesófilo de las hojas de ambas especies antes de la

aplicación del estrés, siendo el tamaño celular significativamente superior en *Sp* respecto a *Sl* (Figura 20A, B). Además, el tamaño de las células del parénquima esponjoso aumentó significativamente en estrés salino respecto a control en la especie silvestre, de forma que las células tenían un aspecto hinchado tras 7 DTS, dejando un espacio intercelular muy reducido entre ellas. De hecho, estas células estaban ocupadas casi totalmente por una gran vacuola, la cual presionaba los cloroplastos y el escaso citoplasma contra la membrana plasmática, de forma que el área de la superficie de los cloroplastos enfrentada a los espacios intercelulares aumentó en salinidad respecto a control (Figura 20C). Esta variación en la morfología de la hoja también parece contribuir a una mejor difusión del CO₂ a la vez que previene la pérdida de agua, y por tanto puede contribuir positivamente al rendimiento de la fotosíntesis en condiciones salinas (Boughalleb *et al.*, 2009).

Finalmente, es interesante considerar que *Sp* no solo evita la pérdida de agua por transpiración en estrés salino, sino que es capaz de aumentar su contenido de agua en el caso de las hojas, alcanzando un valor más de dos veces superior al que poseía en ausencia de estrés (Figura 21). Además, esta mayor capacidad de *Sp* para absorber y transportar más agua que *Sl* se detectó desde el inicio de la aplicación del estrés. Para averiguar si este comportamiento estaba asociado a un patrón de expresión diferencial de acuaporinas, se analizó la acumulación de transcritos de *PIP2;1* y *TIP2;2* a lo largo del estrés salino (Figura 17A). El resultado más llamativo fue la diferente expresión de *PIP2;1* entre ambas especies a nivel basal, menor en la raíz y, sobre todo, mayor en la hoja de *Sp* que en la de *Sl*. Además, las diferencias de expresión de *PIP2;1* en hoja se mantuvieron durante 2 DTS, coincidiendo con la fase temporal en la que no se observaron diferencias de T^a entre *Sp* y *Sl* (Figura 17B). Así, el mayor contenido de agua detectado en *Sp* en esta fase temprana del estrés salino podría estar relacionado con la elevada expresión de *PIP2;1* (Figura 16). De hecho, recientemente la sobreexpresión de *PIP2;1* en plantas transgénicas de tomate se ha asociado con un mayor contenido de agua en las hojas (Li *et al.*, 2016a). También es interesante señalar que, tras 2 DTS, la expresión de *PIP2;1* en las hojas de *Sp* se redujo de forma significativa, coincidiendo con la etapa en la que *Sp* fue capaz de evitar la pérdida de agua por transpiración pero no *Sl*, como se refleja en las diferencias de T^a foliar medidas por TI (Figura 17B). En resumen, el mayor contenido de agua observado en *Sp* en estrés salino podría ser resultado de un proceso coordinado que implicaría una mayor

expresión temprana de genes que promueven el transporte de agua (como *PIP2;1* durante los primeros 2 DTS) seguido de una menor pérdida de agua a través de una reducción de la transpiración.

4.3. La diferente acumulación de Na⁺ entre *S. lycopersicum* y *S. pennellii* está relacionada con un patrón diferencial de expresión de *SOS1* y *HKT1;2*

Las importantes diferencias de tamaño celular observadas entre *Sp* y *Sl* pueden favorecer una mayor capacidad de acumulación de Na⁺ en la especie silvestre, más concretamente en las vacuolas, las cuales ocupan la mayor parte del volumen celular. Por ello, las concentraciones tisulares reflejan en gran medida las concentraciones vacuolares (Flowers *et al.*, 2015). De hecho, la acumulación de Na⁺ fue significativamente superior en *Sp* que en *Sl*, incluso cuando los datos se expresaron en base al agua tisular (Figura 21A). No obstante, se observó una mayor reducción del contenido de K⁺ en *Sp* respecto a *Sl* (Figura 21A), una tendencia que se había descrito previamente en esta especie (Rus *et al.*, 1999). Existen evidencias de que las plantas necesitan una cantidad limitada de K⁺ para las funciones citoplasmáticas, y por tanto la mayoría del K⁺ (aproximadamente el 90 %) se localiza en las vacuolas, donde desempeña un papel no específico en el equilibrio osmótico que puede ser reemplazado por otros cationes, como el Na⁺ (Wakeel *et al.*, 2011). Nuestros resultados corroboran el comportamiento “incluidor” de Na⁺ descrito previamente para *Sp*, que utiliza este catión para llevar a cabo el ajuste osmótico. Además, esta estrategia es menos costosa energéticamente que la síntesis de solutos orgánicos (Tabla 13), que es la estrategia comúnmente utilizada por el tomate cultivado (Alarcon *et al.*, 1993; Santa-Cruz *et al.*, 1999).

Las importantes diferencias de acumulación de Na⁺ observadas entre ambas especies pueden estar asociadas, por una parte, a las adaptaciones anatómicas y, por otra, a los diferentes niveles de expresión de los genes que codifican transportadores de Na⁺ (Hasegawa, 2013; Maathuis, 2014), como los genes *SOS1* y *HKT1* que median flujos opuestos de Na⁺ a través de la membrana plasmática (Olías *et al.*, 2009; Hauser y Horie, 2010). En nuestro estudio, la salinidad no alteró significativamente la expresión de *SOS1* en la raíz de *Sp* y *Sl*, aunque el nivel de expresión fue superior en *Sp* respecto a *Sl* tras 7 DTS. Al mismo tiempo, se detectó un aumento significativo de la expresión de *HKT1;2* en la raíz de *Sl*, pero no en la de *Sp* (Figura 22). Por tanto, la menor expresión

de *SOS1* y, especialmente, la mayor expresión de *HKT1;2* en la especie cultivada reflejaría una mayor descarga de Na^+ del xilema y su acumulación preferente en la raíz. Estos resultados concuerdan con los obtenidos en otros estudios previos en tomate, en los cuales se relacionaba un incremento de la expresión de *HKT1;2* en la raíz con una mayor descarga de Na^+ del xilema y, en consecuencia, con una menor acumulación de Na^+ en las hojas (Asins *et al.*, 2013; Asins *et al.*, 2015; García-Abellán *et al.*, 2014; Almeida *et al.*, 2014). Con respecto a la isoforma *HKT1;1*, nuestros resultados corroboraron los obtenidos previamente por Asins *et al.* (2013) y Almeida *et al.* (2014), puesto que el nivel de expresión de *HKT1;1* fue prácticamente nulo en ambas especies y, por tanto, la principal isoforma implicada en el transporte de Na^+ a la parte aérea es *HKT1;2*. Además, nuestros resultados sugieren que *Sl* es capaz de secuestrar en Na^+ en las vacuolas de las células de la raíz, de acuerdo con su mayor expresión en raíz de *NHX3* y, especialmente, de *NHX4* respecto a *Sp*.

En hoja, cabe destacar el mayor nivel de expresión de *SOS1* detectado en *Sp* en ausencia de estrés (Figura 22), al igual que se había observado previamente en la acuaporina *PIP2;1* (Figura 17A). Se ha sugerido que la diferente expresión basal de genes implicados en la respuesta a estrés es un determinante clave de la tolerancia a la salinidad en especies halófitas (Oh *et al.*, 2009). Curiosamente, la mayor expresión de *SOS1* en *Sp* se mantuvo durante 7 DTS, lo que sugiere que *SpSOS1* tiene una función importante en la tolerancia a la salinidad de la especie silvestre. La importancia de *SOS1* en la tolerancia a estrés salino se determinó previamente en la especie halófito *Thellungiella salsuginea*, en la que la inhibición de la expresión de *SOS1* le confirió una alta sensibilidad al Na^+ (Oh *et al.*, 2009). Además, se ha señalado que *SOS1*, además de una mera función en la carga de Na^+ al xilema, podría tener un papel en la distribución de Na^+ entre diferentes tejidos (Oliás *et al.*, 2009). Puesto que *Sp* utiliza el Na^+ para llevar a cabo el ajuste osmótico, esto implicaría la necesidad de un suministro constante de Na^+ a las hojas a través del torrente de transpiración, como se ha determinado previamente para otras especies halófitas con un comportamiento “incluidor”, como *S. dolichostachya* (Katschnig *et al.*, 2015). En este sentido, la mayor expresión de *SOS1* en las hojas de *Sp* sugiere que este gen podría intervenir en la redirección de Na^+ hacia tejidos específicos que requieren Na^+ para el ajuste osmótico, lo que también concuerda con la disminución de la expresión de *HKT1;2* inducida por la salinidad en las hojas de *Sp* (Figura 22). Además, se ha sugerido que *HKT1;2* en tomate podría estar implicado

en la carga de Na^+ al floema en las hojas fuente y la descarga en órganos sumidero, como el fruto y la raíz (Asins *et al.*, 2015). Asumiendo esta función propuesta, la inhibición de *HKT1;2* en las hojas de *Sp* podría conllevar un menor transporte de Na^+ de la parte aérea a la raíz, probablemente con el propósito de retener más Na^+ en la hoja para el ajuste osmótico.

Finalmente, se observó que la gran capacidad de acumulación de Na^+ en la hoja de *Sp* también estaba relacionada con una mayor expresión de *NHX3* y *NHX4* en este tejido tras 7 DTS (Figura 22). La mayor expresión de *NHX3* y *NHX4* en estrés salino respecto a tomate cultivado también se ha descrito en otra especie silvestre tolerante a salinidad, *S. pimpinellifolium* (Gálvez *et al.*, 2012). Estos resultados reflejan una mayor capacidad de la especie silvestre *Sp* para secuestrar Na^+ en las vacuolas de las células de la hoja durante la salinidad.

En base a los resultados obtenidos, se ha propuesto un modelo para explicar los diferentes procesos y genes implicados en la tolerancia de *Sp* a sequía y salinidad (Figura 33). Nuestros resultados indican que la evitación de la pérdida de agua es un mecanismo esencial para la tolerancia de *Sp* a ambos estreses, y se consigue mediante adaptaciones anatómicas que incluyen la regulación de genes implicados en la modificación de la pared celular y el comportamiento estomático, y la regulación de genes implicados en el movimiento de agua a través de las membranas celulares (acuaporinas). Además, la especie silvestre presenta una mayor capacidad para reducir el daño oxidativo en condiciones de sequía y una mayor expresión de genes implicados en la asimilación de N, que a su vez puede contribuir a mejorar la pérdida de agua por transpiración. Otros genes inducidos en *Sp* en sequía incluyen aquellos implicados en el metabolismo de ET/JA y los señalizadores ERFs, los cuales regulan genes de respuesta a estrés y también pueden afectar al metabolismo del N. En cuanto a los mecanismos específicos de *Sp* frente a estrés salino, nuestros resultados sugieren que la regulación coordinada de los genes *SOS1* y *HKT1;2* determina la translocación de Na^+ a la parte aérea, y con ello el comportamiento “incluidor” de *Sp*. Además, el gran tamaño de las células de las hojas de *Sp*, unido a la mayor expresión de los genes *NHX3* y *NHX4*, reflejan una compartimentación eficiente del Na^+ en la vacuola. Aunque la existencia de otros mecanismos no pueden excluirse, resulta evidente que los diferentes procesos y genes identificados en *Sp* están potencialmente implicados en la respuesta de esta especie silvestre a condiciones de estrés hídrico y salino.

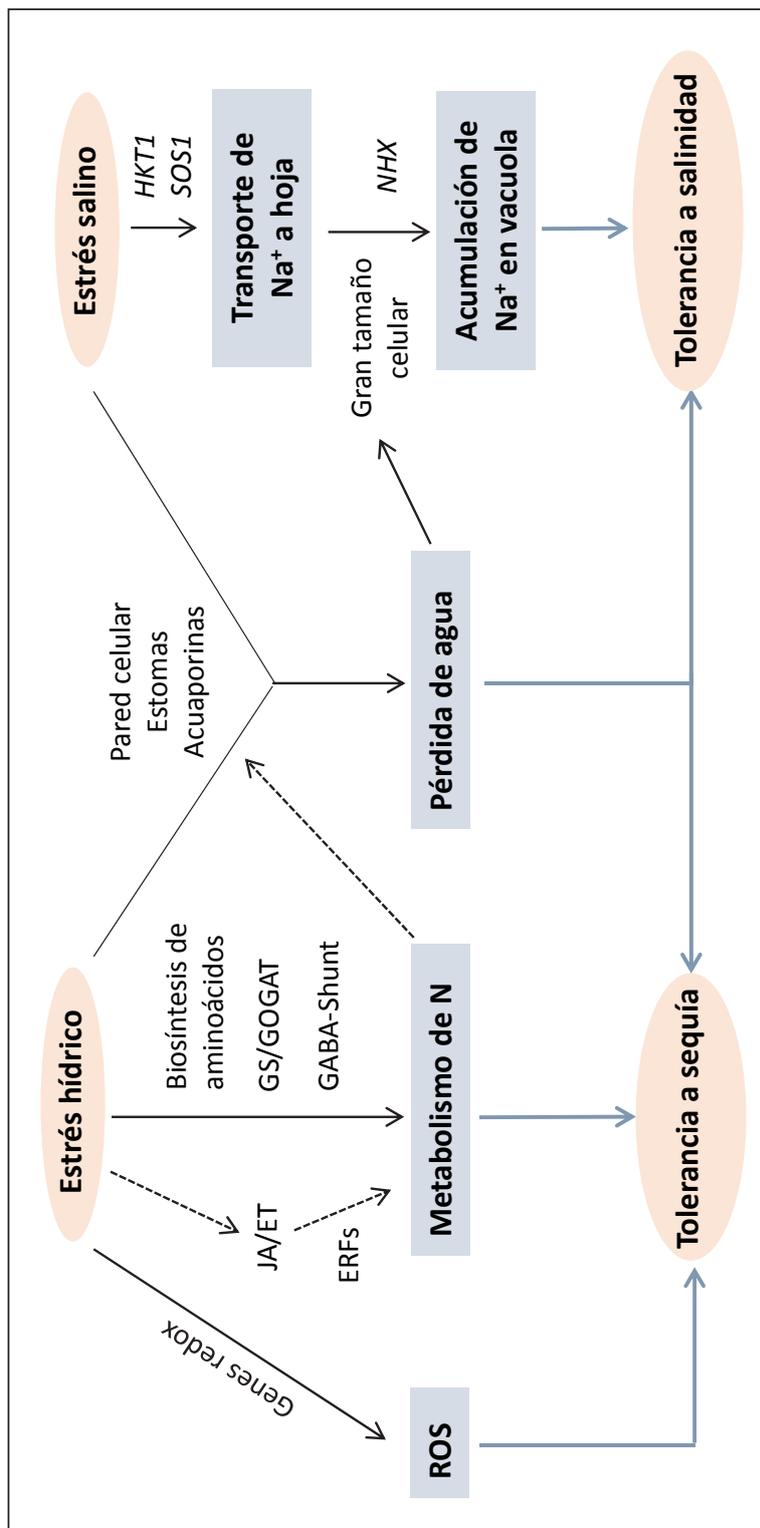


Figura 33. Modelo propuesto en función de los resultados de este trabajo que recoge los procesos fisiológicos y los genes implicados en la tolerancia de *S. pennellii* (*Sp*) a sequía y salinidad. La evitación de la pérdida de agua es un mecanismo crucial en la respuesta frente a ambos estreses, la cual consigue *Sp* mediante adaptaciones anatómicas que incluyen la reducción de la densidad estomática y la regulación de genes implicados en la modificación de la pared celular y el control de la densidad estomática, como el gen *CA1* detectado en el microarray, y genes implicados en el movimiento de agua a través de las membranas celulares (acuaporinas). Además, la especie silvestre posee una mayor capacidad para reducir el daño oxidativo en condiciones de sequía, relacionada con la inducción de genes implicados en la homeostasis redox, como *APX2*. Otros genes inducidos en *Sp* en sequía incluyen aquellos implicados en el metabolismo del nitrógeno y de *ET/IA*, incluyendo los señalizadores *ERFs*, los cuales también pueden afectar al metabolismo del nitrógeno, que a su vez puede contribuir a evitar la pérdida de agua por transpiración. En cuanto a los mecanismos específicos de *Sp* frente a estrés salino, nuestros resultados sugieren que la regulación coordinada de los genes *SOS1* y *HKT1;2* determina la translocación de Na^+ a la parte aérea, y con ello el comportamiento “incluidor” de *Sp*. Además, el gran tamaño de las células de las células de las hojas de *Sp*, unido a la mayor expresión de los genes *NHX3* y *NHX4*, reflejan una compartimentación eficiente del Na^+ en la vacuola.

4.4. El fenotipo del mutante *psh* está relacionado con un co-transporte elevado de agua y Na⁺ a las hojas

A pesar de ser indistinguibles de las plantas WT en condiciones óptimas de crecimiento, la mutación de *psh* induce un transporte masivo de agua y solutos a la parte aérea de la planta, especialmente Na⁺ (Figura 28), que a nivel visual se refleja en una clorosis foliar muy precoz, detectable tan solo 3 días después del inicio del tratamiento salino (Figura 23). Este transporte masivo puede ser debido en parte a un mayor flujo de transpiración por una alteración constitutiva en el número de estomas del mutante. Así, aunque la densidad estomática en la superficie abaxial de la hoja era menor en *psh* en ausencia de estrés salino, se observan algunas alteraciones con la sal que favorecen un mayor transporte a la parte aérea en el mutante: en primer lugar, a diferencia de las plantas WT, las plantas *psh* no redujeron el número de estomas durante el estrés salino; en segundo lugar, la apertura estomática en el mutante en salinidad fue significativamente superior a la de WT (Figura 27). En principio, una mayor apertura estomática conllevaría una mayor transpiración y, por tanto, mayor pérdida de agua; no obstante, en el mutante se observó un mayor contenido de agua en las hojas.

Por otro lado, los conceptos actuales de transporte a través de las membranas vegetales se basan en la suposición de que el agua y los solutos atraviesan las membranas a través de vías separadas. Así, se acepta ampliamente que el agua se mueve de forma pasiva entre compartimentos celulares, impulsada exclusivamente por una diferencia de potencial hídrico (ψ), mientras que el transporte de solutos no sigue necesariamente el gradiente (electro)químico de un soluto particular. Además de las bombas iónicas como la H⁺-ATPasa y la Ca²⁺-ATPasa, que transforman directamente la energía química en una fuerza motriz de protones y un gradiente de Ca²⁺ transmembrana, respectivamente, los co-transportadores y antiportadores acoplan el transporte de un soluto al gradiente químico de otro (Poole, 1978; Williams *et al.*, 2000). Hasta hace poco el agua no se consideraba un sustrato para el transporte acoplado, al menos en plantas. Sin embargo, en los últimos años ha surgido el concepto de co-transporte agua-iones (Wegner, 2014; Fricke, 2015; Fricke, 2016; Wegner, 2017) y se cree que podría estar implicado en la regulación de importantes procesos fisiológicos como la turgencia de las hojas, la elongación celular y la osmorregulación. Morillon *et al.* (2001) plantearon que el turgor (y la hinchazón celular asociada) en las hojas podría generarse por absorción de agua

energizada por el transporte de solutos, como KCl y/o NaCl, aunque aún se necesitan evidencias experimentales de esta hipótesis.

Hasta no hace mucho, las acuaporinas vegetales se consideraban canales de agua muy selectivos (permitiendo únicamente el paso de pequeñas moléculas neutras como NH₃ y CO₂). Sin embargo, este concepto está empezando a revisarse, ya que recientemente Byrt *et al.* (2016) demostraron que la acuaporina *AtPIP2;1* de Arabidopsis, al ser expresada en oocitos de *Xenopus laevis*, no solo era permeable al agua sino también al Na⁺, exhibiendo características típicas de canales de cationes no selectivos (NSCCs). En nuestro estudio, la acuaporina homóloga a *PIP2;1* en tomate mostró un perfil de expresión muy diferente en *psh* y WT, siendo superior en la raíz y menor en la parte aérea del mutante respecto a WT en ausencia de estrés, mientras que en salinidad se produjo una inducción progresiva de *PIP2;1* en las hojas de *psh* y una inhibición en las hojas de WT (Figura 30). La sobreexpresión de *SIPIP2;1* en plantas transgénicas de tomate y Arabidopsis se ha relacionado con una mayor conductancia hidráulica, indicando su papel en la absorción de agua a través de la raíz, y también con un mayor contenido de agua en las hojas en condiciones de estrés abiótico (Li *et al.*, 2016a). Así, nuestros resultados en raíz indicarían una mayor predisposición a absorber agua (y Na⁺) en el mutante respecto a WT. Además, la inducción de *PIP2;1* en hoja en *psh* durante el estrés salino podría estar relacionada con un mayor transporte de agua y Na⁺ en las células del mesófilo de la hoja en el mutante durante este periodo. Curiosamente, la expresión de *PIP2;1* se inhibió progresivamente en la hoja de WT durante el estrés salino (Figura 30 y Figura 17A), lo cual podría formar parte del mecanismo de la especie silvestre para minimizar la pérdida de agua por transpiración durante el estrés. En este sentido, la sobreexpresión de otra acuaporina, *SITIP2;2*, en plantas transgénicas de tomate indujo una mayor permeabilidad al agua a nivel celular y también una mayor tasa de transpiración en condiciones de estrés hídrico (Sade *et al.*, 2009). En nuestro estudio, la acuaporina *TIP2;2* mostró una mayor expresión en las hojas de *psh* respecto a WT en ausencia de estrés. Además, si bien Sade *et al.* (2009) señalaron que la participación de *TIP2;2* en la movilización de Na⁺ era improbable, más recientemente Xin *et al.* (2014) sugirieron que podría tener un papel en la homeostasis de Na⁺ y/o K⁺. En resumen, el transporte masivo de Na⁺ y agua observado en el mutante *psh* podría estar relacionado con una alteración en la actividad de canales implicados en el co-

transporte de agua e iones, como la acuaporina *PIP2;1*, y probablemente otras como *TIP2;2*.

Alternativamente, el transporte de Na^+ a la parte aérea de *psh* podría estar relacionado con una alteración en la actividad de los transportadores implicados en la homeostasis de Na^+ . De hecho, la expresión de *HKT1;2* estaba anulada en la raíz del mutante en ausencia de estrés (Figura 31) y también fue significativamente menor en tallo y hoja de *psh* respecto a WT durante 0-3 DTS. Como se ha mencionado anteriormente, *HKT1;2* en tomate está implicado en la descarga de Na^+ del xilema y por tanto regula su transporte a la parte aérea (Asins *et al.*, 2013; Jaime-Pérez *et al.*, 2017). Una mayor expresión de *HKT1;2* en la raíz de *S. lycopersicum* se ha correlacionado con una menor acumulación de Na^+ en hoja (Asins *et al.*, 2013; García-Abellán *et al.*, 2014; Almeida *et al.*, 2014), también corroborado en nuestro estudio comparativo entre *Sp* y *Sl* (Figura 22). La isoforma *HKT1;2* en tomate posee una alta homología con *AtHKT1;1* de Arabidopsis, cuya mutación disfuncional causó hipersensibilidad en hojas 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 forma similar a la respuesta observada en *psh*. Además, dada la detección de su expresión en las células del floema, otra función que se ha propuesto para *HKT1;2* es la carga de Na^+ al floema en las hojas para su redistribución en órganos sumidero, como frutos y raíces (Asins *et al.*, 2015). Por tanto, la hipersensibilidad a la salinidad en las hojas de *psh* podría deberse a la combinación de una pérdida de función de *HKT1;2* en la raíz, provocando un aumento del transporte de Na^+ desde la raíz a la hoja, y la pérdida de función de *HKT1;2* en las células de los haces vasculares de la hoja, dificultando la carga de Na^+ al floema en la hoja para su redistribución a órganos sumidero. En ambos casos, la pérdida de función de *HKT1;2* favorecería la acumulación de Na^+ en las células del mesófilo foliar y requeriría de una compartimentación vacuolar efectiva, la cual podría verse reflejada en la inducción de *NHX4* tras 1 DTS y *NHX3* tras 3 DTS en las hojas de *psh* respecto a las de WT. También es interesante señalar la inducción de *HKT1;2* observada en la raíz de *psh* tras 3 DTS (Figura 31), que podría indicar la inducción de los mecanismos para limitar el transporte de Na^+ a la parte aérea una vez se produce la saturación de dichos tejidos. En principio, la inducción de *HKT1;2* en salinidad en el mutante nos lleva a descartar que la mutación genética responsable del fenotipo *psh* sea

la anulación de este gen, y sugiere que la expresión reducida de *HKT1;2* en el mutante es un efecto indirecto causado por la mutación.

La anulación de *AtHKT1;1* en *Arabidopsis* (Mäser *et al.*, 2002; Berthomieu *et al.*, 2003) y *HKT1;2* en tomate (Jaime-Pérez *et al.*, 2017) también causó una reducción del contenido de K^+ en la parte aérea de la planta, de forma similar a la respuesta observada en *psh* (Figura 29). Adicionalmente, para determinar si las diferencias en el contenido de K^+ entre las plantas mutantes y WT estaban relacionadas con un patrón de expresión diferencial en genes implicados en el transporte de K^+ , se analizó la expresión del gen *SKOR*, el cual se expresa en células estelares de la raíz alrededor de los haces vasculares y cuya función es cargar K^+ al xilema para su transporte a la parte aérea de la planta (Gaymard *et al.*, 1998). Nuestros resultados corroboraron la expresión preferencial de este gen en la raíz, si bien solo se observó una expresión menor en el mutante respecto a WT durante 1 DTS (Figura 32). Por tanto, no parece probable que las diferencias observadas en el contenido de K^+ en la parte aérea entre *psh* y WT se deban a diferencias en la actividad de SKOR.

4.5. El transporte masivo de Na^+ a las hojas satura la capacidad vacuolar en el mutante *psh* y causa citotoxicidad

El tomate cultivado *S. lycopersicum* y las especies silvestres relacionadas poseen un comportamiento diferencial en cuando a la acumulación de Na^+ . Mientras que *S. lycopersium* generalmente exhibe un comportamiento “excluidor”, la mayoría de las accesiones silvestres, entre ellas *S. pennellii*, se comportan como “incluidoras” (Cuartero *et al.*, 2006). Sin embargo, el mecanismo “incluidor” o “excluidor” *per se* no define inequívocamente la tolerancia o sensibilidad a un estrés determinado. Flowers y Colmer (2008) sugirieron que la toxicidad del Na^+ en el metabolismo de las plantas no difiere en gran medida entre halófitas y glicófitas, siendo crucial en ambos casos el mantenimiento de la concentración de Na^+ dentro de los límites de la capacidad fisiológica. El Na^+ que es absorbido por la planta debe ser secuestrado de manera eficiente en las vacuolas para evitar su toxicidad (Shabala y Mackay, 2011). El daño celular en las hojas se debe a la acumulación de Na^+ en el citosol o el apoplasto, cuando el Na^+ exportado desde las raíces es superior al transportado a través de la membrana plasmática de las células de la hoja, o cuando la capacidad de almacenaje vacuolar se satura (Munns y Tester, 2008). Debido al límite de la capacidad vacuolar, tanto las

especies “incluidoras” como “excluidoras” deben ser capaces de regular el transporte de Na^+ hasta las hojas, aunque ello ocurra a diferentes niveles de estrés o diferentes periodos de tratamiento. Como especie halófila incluidora, *S. pennellii* utiliza el Na^+ como un agente osmótico para mantener la turgencia celular, lo que implica un transporte rápido del Na^+ a la parte aérea de la planta. Para asegurar la efectividad de este mecanismo sin sufrir los efectos tóxicos del Na^+ , *S. pennellii* posee hojas gruesas con grandes células ocupadas por enormes vacuolas que aseguran una elevada capacidad de almacenamiento de Na^+ (Figura 20). Considerando globalmente nuestros resultados, en la Figura 34 se propone un modelo en el cual el transporte descontrolado de Na^+ a las hojas del mutante *psh* supera la capacidad vacuolar de esta especie (Figura 26), por lo que finalmente se produce la acumulación de Na^+ en el citosol y con ello la citotoxicidad observada en el mutante.

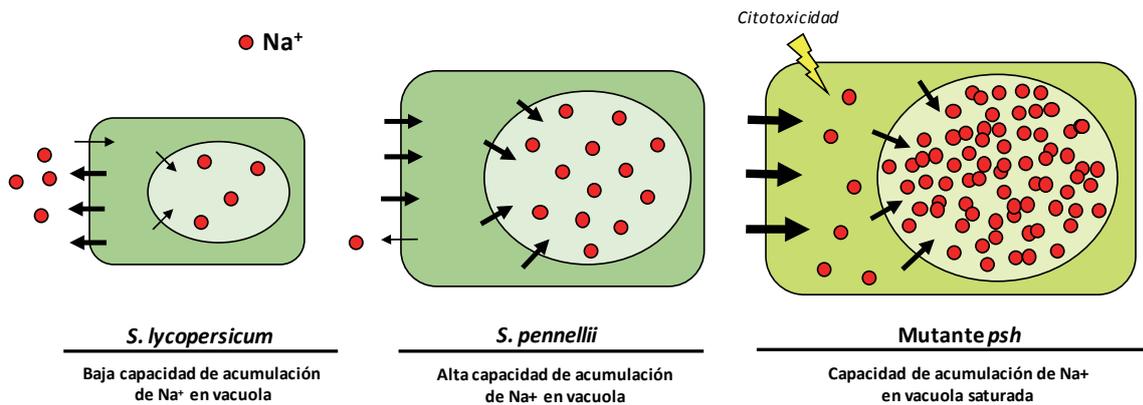


Figura 34. Modelo comparativo de la regulación de la homeostasis de Na^+ en las hojas de *S. lycopersicum*, *S. pennellii* y el mutante *pennellii salt hypersensitive* (*psh*) acorde a los resultados obtenidos en este trabajo. En el esquema se representa una célula del mesófilo foliar para cada genotipo, con una vacuola en su interior (elipse). Los círculos de color rojo representan iones Na^+ , y las flechas la dirección del transporte del mismo, donde las flechas más finas y más gruesas indican un flujo menor o mayor de Na^+ , respectivamente. El tamaño celular (y vacuolar) de *S. lycopersicum* es inferior al de *S. pennellii*, y ante un estrés salino la especie cultivada tratará principalmente de excluir el Na^+ de la parte aérea, y alternativamente almacenará el que penetre en las células en el interior de la vacuola. Por el contrario, las grandes vacuolas de *S. pennellii* favorecen una mayor acumulación de Na^+ en las hojas de esta especie “incluidora”, el cual es utilizado como agente osmótico de bajo coste energético. Sin embargo, el transporte de Na^+ a las hojas del mutante *psh* es tan elevado que parece saturar la capacidad vacuolar, por lo que finalmente el Na^+ se acumula en el citosol y causa toxicidad.

CAPÍTULO II

V. CAPÍTULO II

ANÁLISIS TRANSCRIPTÓMICO DEL MUTANTE DE TOMATE *res* (*restored cell structure by salinity*) E IDENTIFICACIÓN DEL GEN RESPONSABLE DEL FENOTIPO MUTANTE

1. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

Dentro del programa de mutagénesis insercional de tomate, identificamos un mutante de desarrollo que se caracterizaba por su notable inhibición del crecimiento y alteraciones estructurales en raíces y hojas, incluyendo anomalías en la estructura de los cloroplastos. Sin embargo, cuando las plantas se sometían a tratamiento salino se normalizaba su fenotipo y recuperaban la estructura celular propia del tomate, por lo que el mutante fue denominado *res* (*restored cell structure by salinity*) (García-Abellán *et al.*, 2015). En la caracterización del mutante se observó una elevada acumulación de jasmonato (JA) en raíz, así como alta expresión de genes implicados en la biosíntesis y señalización de JA, siendo el primer mutante de sobreexpresión de JA identificado en tomate (García-Abellán *et al.*, 2015). Es interesante señalar que la acumulación tiene lugar en raíz, donde el papel del JA ha sido escasamente estudiado (Grebner *et al.*, 2013, Tytgat *et al.*, 2013).

El JA es una hormona defensiva clave en prácticamente todas las especies vegetales. La mayoría de los estudios sobre JA se han centrado en la respuesta a estreses bióticos y daño mecánico, aunque también se ha demostrado su papel en la respuesta a estreses abióticos (Wasternack y Hause, 2013; Wasternack, 2014; Gollack *et al.*, 2014; Ismail *et al.*, 2014). En este sentido, el mutante *res* parece ser tolerante a otros estreses abióticos, puesto que las plantas recuperan el fenotipo normal, alcanzando niveles de contenido y fluorescencia de clorofilas similares a los del WT, cuando se desarrollan en las condiciones semi-áridas del sureste español, con alta temperatura y luminosidad y baja humedad relativa (García-Abellán *et al.*, 2017). Por otra parte, mientras que la mayoría de las líneas de tomate muestran diferentes síntomas de daños por ataques de patógenos e insectos en nuestras condiciones de verano en invernadero, las plantas de

res apenas se ven afectadas, lo que sugiere que este mutante puede ser también tolerante a estreses bióticos.

Frente al cambio climático un objetivo prioritario es la optimización del balance desarrollo-tolerancia a estrés para maximizar el rendimiento de los cultivos en condiciones medioambientales adversas (Huot *et al.*, 2014). La activación de la ruta de señalización de JA restringe severamente el desarrollo de la planta mientras que activa los genes de defensa frente al estrés, representando un claro ejemplo del balance desarrollo-defensa en plantas (Mitra y Baldwin, 2014; Claeys e Inzé, 2013; Larrieu y Vernoux, 2016). Esta situación parece producirse en el mutante *res*, y por tanto un objetivo de esta tesis ha sido el análisis transcriptómico de *res* en control y estrés salino, ya que dicho análisis podría contribuir a comprender las bases moleculares que regulan el balance desarrollo-defensa, e identificar genes clave implicados en la adaptación y supervivencia del tomate frente a la salinidad.

A pesar de que el mutante *res* se identificó dentro de la colección de líneas T-DNA generada a partir del cultivar MoneyMaker, se comprobó que no era un mutante insercional (García-Abellán *et al.*, 2015), fenómeno que se ha observado frecuentemente no solo en tomate (Pérez-Martín *et al.*, 2017), sino también en los programas de mutagénesis insercional llevados a cabo en otras especies (Miyao *et al.*, 2007; Wang y Wang, 2012). Dado el interés del mutante *res*, otro objetivo prioritario ha sido la identificación del gen *RES* y el análisis funcional del mismo.

2. METODOLOGÍA

2.1. Análisis transcriptómico de tomate vs mutante *res* en control y estrés salino

Un primer objetivo de esta sección de la tesis fue el análisis transcriptómico comparativo entre tomate cultivado (WT) y el mutante *res* en ausencia de estrés y en condiciones de salinidad. Los ensayos de estrés salino se llevaron a cabo en condiciones de cultivo hidropónico siguiendo las condiciones descritas en el apartado 2.2 de la sección de Materiales y Métodos. Un total de 18 plantas de cada especie se distribuyeron de forma aleatoria en dos cubetas de cultivo hidropónico llenas de disolución Hoagland al 50% (cada cubeta contenía nueve plantas de cada especie). El

tratamiento salino se aplicó cuando las plantas alcanzaron un estado de desarrollo de 4-5 hojas completamente desarrolladas, y consistió en disolución Hoagland al 50% más una concentración de 200 mM NaCl durante 5 días aplicada gradualmente (el primer día 100 mM NaCl y el resto 200 mM NaCl) para evitar un choque osmótico severo. Se realizaron muestreos en control (día 0) y tras 5 días de tratamiento salino (5 DTS), momento en el que comenzaba a observarse claramente la reversión fenotípica del mutante. En cada muestreo se incluyeron tres réplicas biológicas, cada una de ellas incluyendo tres plantas de cada especie. Previamente a los muestreos destructivos se determinó el contenido de clorofila y la eficiencia fotosintética (F_v/F_m) en folíolos de la 1ª hoja desarrollada de cada planta, siguiendo el procedimiento descrito en apartado 3.6 de la sección de Materiales y Métodos. Para los análisis moleculares, se separaron en cada planta los folíolos de la 1ª hoja desarrollada y la raíz y se agruparon por réplicas biológicas. Las muestras se congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido y se guardaron a -80°C .

El análisis microarray se llevó a cabo en la Sección de Biología Molecular del Servicio de Apoyo a la Investigación de la Universidad de Murcia. Se partió de RNA de folíolos de la 1ª hoja desarrollada y de raíces de las tres réplicas biológicas de WT y *res* muestreadas previamente. Cada muestra se hibridó en un chip, por lo que se obtuvieron un total de 24 chips (tres réplicas biológicas para cada genotipo, tejido y tratamiento). La extracción de RNA se realizó mediante el kit comercial RNeasy Plant Mini (Qiagen, Hilden, Alemania), cuyo protocolo se detalla en el apartado 5.1 de la sección de Materiales y Métodos. La cantidad y calidad del RNA se comprobó en un bioanalizador (Agilent, Santa Clara, CA, EEUU), y espectrofotométricamente en un Nanodrop® ND-2000 (ThermoScientific, Waltham, MA, EEUU). El cDNA de cadena simple (ss-cDNA) fue sintetizado a partir de 100 ng de cada muestra de RNA mediante el kit comercial GeneChip WT PLUS Reagent (Affymetrix, Santa Clara, CA, EEUU), de acuerdo a las recomendaciones del fabricante. Después de comprobar su calidad mediante bioanalizador y Nanodrop, el ss-cDNA fue lavado, fragmentado y biotinilado de acuerdo al protocolo del mismo kit. A continuación 3,5 μg del cDNA biotinilado se incluyeron en las mezclas de hibridación utilizando el kit Hybridization, Wash and Stain (Affymetrix) siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante. Las preparaciones resultantes se hibridaron en el microarray GeneChip® Tomato Gene 1.1 ST Array Strip (Affymetrix), el cual ofrece cobertura de todo el transcriptoma de tomate, con 26 sondas

únicas para cada transcrito. Tras el escaneo los datos del microarray se procesaron mediante el programa Affymetrix Expression Comand Console (Affymetrix) y se comprobó que las 24 muestras superaban los criterios de calidad de marcaje e hibridación. El análisis de datos se realizó mediante el método RMA (Robust Multiarray Average) que permitió corregir los valores de intensidad sin procesar, transformarlos en \log_2 y cuantificarlos con el fin de obtener un valor de intensidad individual para cada conjunto de sondas. Mediante el Análisis de Componentes Principales no supervisado (PCA) y agrupamiento jerárquico se comprobó que las muestras se agrupaban en función del genotipo y tratamiento. Se utilizaron los programas Partek Genomics Suite y Partek Pathways (Partek Incorporated, St. Louis, EEUU) para obtener la anotación de las sondas y realizar los análisis estadísticos, que consistieron en un test ANOVA con un umbral restrictivo (p -valor $\leq 0,05$), y un test FDR (Benjamini y Hochberg, 1995). Los genes que presentaron un valor de FDR $\leq 0,05$ y un valor de *fold-change* (relación de diferencias de expresión) $\geq 2,0$ al comparar WT y *res* en la misma condición experimental, o al comparar distintas condiciones experimentales para el mismo genotipo, fueron considerados genes diferencialmente expresados (GDEs). Para la categorización funcional de los GDEs se utilizó el programa Mapman (Thimm *et al.*, 2004) con la base de datos Slyc_ITAG2.3 (secuencias de referencia de tomate en Sol Genomics Network) (<https://solgenomics.net/>). Los datos del microarray se depositaron en la base de datos de NCBI Gene Expression Omnibus (GEO) (Edgar *et al.*, 2002) con número de referencia GSE106149.

2.1.1. Validación del microarray mediante RT-qPCR

Para verificar la fiabilidad de los resultados obtenidos en el microarray, se analizó la expresión mediante RT-qPCR de 14 genes seleccionados por su relevancia en el análisis. El procedimiento seguido se encuentra detallado en el apartado 5 de la sección de Materiales y Métodos. A continuación se presentan las secuencias de los cebadores utilizados para cada gen de interés (Tabla 14):

Tabla 14. Parejas de cebadores utilizados en los ensayos de RT-qPCR para la validación de microarray del mutante *res*.

Gen	Secuencia del cebador (5'-3')
<i>RCA1</i>	Sentido: AGAACTTGAGGCTGGTTGCT
	Anti-sentido: GTTGATCATCGGACACATCGTT
<i>AOX1A</i>	Sentido: GGAGCAACAAGGATGACACGA
	Anti-sentido: CAGCGACTCCACCAACAAC
<i>Gl</i>	Sentido: CATTGCTCGAGTGCAAACAC
	Anti-sentido: AACTTGCGATCCCTTACCA
<i>WRKY39</i>	Sentido: GTGAAAATGGGATGGGCTAA
	Anti-sentido: TAATTTCAAGGGCCACCAA
<i>MYB14</i>	Sentido: CAGCTCCAAGTTCCAAGTGA
	Anti-sentido: TGCTCCATGGACCTCTTTTC
<i>MPI</i>	Sentido: GCACAAGATGCAACTCTGACG
	Anti-sentido: CCTGACAGAACGTACCACCA
<i>AOS</i>	Sentido: CGAACTCTCCACGAAAGGTA
	Anti-sentido: TTCCAAGTTCGGTGTCTTGA
<i>JAZ1</i>	Sentido: ACCTGATCAACCAGAGAAGGC
	Anti-sentido: GTGGGGTTCTGTTTGTGGC
<i>Ca²⁺-ATPase</i>	Sentido: CTATTGACGGCCTGGAAC
	Anti-sentido: GGTACGATGCTTGCCCAAT
<i>GA20OX-2</i>	Sentido: GGAGAGTTTAGGGGTCGAAA
	Anti-sentido: TAGTTTCACTGCTTTGGGGT
<i>Expansin</i>	Sentido: CTCAACCAGCTTGGGAAAAA
	Anti-sentido: CTGATTCAACAGATCCTGCC
<i>Extensin</i>	Sentido: ACTATGAGCAATCGCCTACA
	Anti-sentido: GAGGTGAAGCATAGGTGACA
<i>ns-LTP</i>	Sentido: CATGGCTTCTACGTTTTCA
	Anti-sentido: CAACACACACCCAACAAAC
<i>Guanylate-binding protein</i>	Sentido: GCTTGACTGCCTCACTGAAAT
	Anti-sentido: GGTACGATGCTTGCCCAAT

2.2. Identificación y análisis funcional del gen *RES*

2.2.1. Mapeo del locus *RES* y alineamiento de secuencias

Para localizar la posición genómica del locus *RES*, una planta de fenotipo *res* proveniente de una línea TG₅ homocigota fue cruzada con una planta de la especie silvestre *S. pimpinellifolium* accesión LA1589, obteniéndose la descendencia F1. A continuación, un individuo F1 fue autopolinizado, y la generación F2 obtenida se fenotipó, se sometió a un análisis de segregación fenotípica, y se utilizó en el mapeo y clonaje del gen *RES*. Los marcadores genéticos utilizados se seleccionaron de un mapa

genético de tomate publicado recientemente (Capel *et al.*, 2017) y el genotipado fue llevado a cabo por el grupo de investigación de la Universidad de Almería liderado por el Prof. Rafael Lozano, tal y como se describe en Capel *et al.* (2015).

El alineamiento de las secuencias de aminoácidos de RH39 de *Arabidopsis* (accesión NP_849348.1 de Genbank) y DEAD39 de tomate (XP_004252562.1) se llevó a cabo mediante Clustal utilizando los parámetros estadísticos recomendados por defecto (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>).

2.2.2. Generación de líneas transgénicas de sobreexpresión y silenciamiento génico

El diseño de las construcciones genéticas de silenciamiento y sobreexpresión de *SIDEAD39* y la transformación de *Agrobacterium tumefaciens* con dichas construcciones se llevó a cabo en el laboratorio del grupo de investigación de Genética de la Universidad de Almería dirigido por el Prof. Rafael Lozano, mientras que la transformación de tomate para obtener las líneas transgénicas de sobreexpresión y silenciamiento fue realizada por el grupo de investigación de Biotecnología y Cultivo *in vitro* dirigido por el Prof. Vicente Moreno del IBMCP (UPV-CSIC, Valencia). Para las líneas de sobreexpresión y complementación se amplificó la secuencia codificante completa de *SIDEAD39* (*open reading frame*) a partir de cDNA de *S. lycopersicum* (cv. Moneymaker) utilizando los cebadores RH-339FcG y RH-339RcG (Tabla 15). El producto de PCR fue clonado en el vector binario pROKII (Baulcombe *et al.*, 1986), generándose así las construcciones génicas de sobreexpresión (35S::*SIDEAD39*). Las construcciones de silenciamiento génico se generaron mediante una estrategia de RNA interferente (RNAi). Para ello, se amplificó un fragmento de 126 pb de la secuencia de cDNA de *SIDEAD39* mediante los cebadores RH-339Fi y RH-339Ri (Tabla 15) y fue clonado en orientación 5'-3' y 3'-5' con separación mediante secuencias intrónicas en el vector pKannibal (Wesley *et al.*, 2001), generando el plásmido pKannibal-*SIDEAD39*. Este plásmido se digirió posteriormente con NotI, y la construcción completa fue clonada en el vector binario pART27 (Gleave, 1992).

Tabla 15. Secuencia de los cebadores utilizados para generar las construcciones de sobreexpresión y silenciamiento de SIDEAD39.

Cebador	Secuencia del cebador (5'-3')
RH-339FcG	GGAGCTTTAGCCTCTGTATATACTCC
RH-339RcG	CATTGCACAATTTGATGACCA
RH-339Fi	AGACACTGGAGCTTCGGCTA
RH-339Ri	GATCCCCAGGAACCAAGTTT

En todos los casos, los vectores binarios generados se introdujeron mediante electroporación en la cepa LBA 4404 de *Agrobacterium tumefaciens* para la posterior transformación genética de tomate, la cual se llevó a cabo en el laboratorio del grupo del IBMCP siguiendo los protocolos descritos en Gisbert *et al.* (2000) y Atarés *et al.* (2011). Para la generación de líneas de complementación, la transformación genética se llevó a cabo en plantas de fondo genético *res*. Se generaron al menos siete líneas independientes de sobreexpresión, complementación y silenciamiento, las cuales se cultivaron *in vitro* en medio de cultivo con ½ de sales minerales de Murashige y Skoog (MS) (Duchefa, Biochemie B.V., Haarlem, Holanda), 10 g·L⁻¹ de sacarosa (Panreac, Química S.L.U., Castellar del Vallès) y 1 mg·L⁻¹ de ácido indol-3-acético (Sigma-Aldrich, Química S.L., Madrid). Posteriormente las líneas transgénicas fueron aclimatadas y trasladadas al invernadero para obtener semillas y estudiar su fenotipo y su respuesta a salinidad *in vivo*.

2.2.3. Ensayos de caracterización de las líneas de sobreexpresión, complementación y silenciamiento de *RES*

La caracterización fenotípica de las líneas transgénicas de sobreexpresión, complementación y silenciamiento del gen *RES* se llevó a cabo en cultivo hidropónico, conjuntamente con plantas WT y *res* como referencia, siguiendo las condiciones descritas anteriormente (ver apartado 2.2 de la sección de Materiales y Métodos). El tratamiento salino consistió en disolución Hoagland al 50% más 200 NaCl durante 10 días (el primer día 100 mM NaCl y el resto de días 200 mM NaCl). A lo largo del tratamiento salino, se analizó el contenido de clorofila y la eficiencia fotosintética (*Fv/Fm*) en folíolos de la 1ª hoja desarrollada de cada planta, siguiendo el procedimiento descrito en el apartado 3.6 de la sección de Materiales y Métodos. Además, tanto en control como al final del tratamiento salino, se estudió la estructura

celular mediante microscopía, siguiendo el protocolo descrito en el apartado 4.2 de la sección de Materiales y Métodos. Por último, para comparar el diferente grado de desarrollo de las líneas, en cada planta se determinó el número de hojas desarrolladas, diámetro del tallo, número de racimos y número de brotes secundarios desarrollados. Se analizaron al menos dos líneas transgénicas independientes en cada caso, incluyendo tres réplicas biológicas de tres plantas cada una, tanto en control como al final del tratamiento salino.

2.2.4. Análisis Northern Blot

Para estudiar el procesamiento del rRNA 23S, se llevó a cabo un análisis Northern blot en plantas WT y *res* procedentes de cultivo hidropónico en las mismas condiciones descritas anteriormente, en ausencia de estrés (control) y en estrés salino (5 días 200 mM NaCl). Se muestrearon los folíolos de la 1ª y la 4ª hoja desarrollada y el tallo de cada planta, y se agruparon en réplicas biológicas de tres plantas cada una, tras lo cual se congelaron inmediatamente en N₂ líquido. El RNA se extrajo como se ha descrito en el apartado 5.1 de la sección de Materiales y Métodos, y después se separó electroforéticamente y se transfirió a una membrana de nylon Hybond-N⁺ (GE Healthcare, Chicago, IL, EEUU), siguiendo el protocolo descrito en Ausubel *et al.* (1993). Las parejas de cebadores empleadas para generar las sondas para la secuencia del rRNA 23S se muestran en la Tabla 16, y los productos de PCR fueron clonados y secuenciados para confirmar su identidad. A continuación se generaron las sondas radiactivas a partir de estos productos de PCR con P³² (dCTP) mediante el kit High Prime DNA Labelling (Roche, Basilea, Suiza).

2.2.5. Análisis de expresión génica de genes que codifican DEAD-box RNA helicasas mediante RT-qPCR

En primer lugar, se analizó el patrón de expresión de *SIDEAD39* en distintos tejidos de plantas *res* y WT en ausencia de estrés: raíz, 1ª y 3ª hoja desarrollada, tallo a la altura de la inserción de dichas hojas, flores y frutos. Para ello, se cultivaron plantas de ambos genotipos en sustrato (mezcla de turba negra y perlita en proporción 8:3), en macetas con capacidad de 10 L. El muestreo de los distintos tejidos se llevó a cabo cuando las plantas alcanzaron el estadio de 16-18 hojas desarrolladas.

Por otra parte, se analizó la evolución de la expresión de los nueve genes que codifican DEAD-box RNA helicasas (DBRHs) cloroplastidiales (Tabla 17) en la 1ª y la 3ª hoja desarrollada de plantas WT, *res* y de la línea de silenciamiento RNAi-9 a lo largo del tratamiento salino (200 mM NaCl durante 5 días). El muestreo de los distintos tejidos se llevó a cabo cuando las plantas alcanzaron el estadio de 4-5 hojas desarrolladas.

En ambos casos, los tejidos se agruparon por réplicas biológicas (n=9) y se congelaron inmediatamente en N₂ líquido. La extracción de RNA y el análisis RT-qPCR se llevaron a cabo como se ha descrito previamente en el apartado 5 de la sección de Materiales y Métodos. Las secuencias de los cebadores utilizados para cada gen de interés se recogen en la Tabla 17.

Tabla 16. Secuencia de los cebadores utilizados para generar las sondas radiactivas para hibridación de los distintos fragmentos de la secuencia del rRNA 23S.

Cebador	Secuencia del cebador (5'-3')
23SFL_F	TTCAAACGAGGAAAGGCTTACGGTG
23SFL_R	AGGAGAGCACTCATCTTGGGGTGG
23SP1_F	CGAGGAAAGGCTTACGGTGGATAC
23SP1_R	AAGATGTTTCAGTTCGCCAGGTTG
23SP2_F	CCTGTACTACCCCTTGTTAGTC
23SP2_R	CCTGTCATCAGGTCACCAACT

Tabla 17. Parejas de cebadores utilizados en los ensayos de RT-qPCR para analizar la expresión de los distintos genes que codifican DEAD-box RNA helicasas del cloroplasto.

Gen	Secuencia del cebador (5'-3')
DEAD5	Sentido: GGCTTTGAATCCTCCCTAGC
	Anti-sentido: CCGTGCAATGCAACAATTA
DEAD11	Sentido: GTCTGCTGGTGGTCTCCAAT
	Anti-sentido: TGGGAAACAGGGTTGAGTTC
DEAD17	Sentido: GCTTCACACATGAGGTGAAAAA
	Anti-sentido: TGTGGAGAAAACAAATGCAAAA
DEAD23	Sentido: AACCCCTTTGCTCCAAAATA
	Anti-sentido: CAAAATATGGAAGGCGGTTG
DEAD25	Sentido: GTGCTTTCTGGAGGGAACAG
	Anti-sentido: TGTGAAAGCCAGCAATGAAG
DEAD28	Sentido: ATGTGCTCTACTCCGATGG
	Anti-sentido: TTGCTGATTTCCATTCTTGC
DEAD33	Sentido: ACTTTTGTGGACGGTTTTTG
	Anti-sentido: AACCAATAAATAAACCGGATCTCA
DEAD35	Sentido: TGAAACTTGCCCTGCAACAG
	Anti-sentido: AAGCCGTTTTGATGTCTTCG
DEAD39	Sentido: GCCATTTTGTGAGGTCCTG
	Anti-sentido: TGATGACAAACATAGGGTCACT

3. RESULTADOS

3.1. Análisis transcriptómico comparativo en raíz y hoja de plantas WT y del mutante *res* desarrolladas en control y en medio salino

El mutante *res* presenta una marcada clorosis foliar desde el estadio de cotiledón e inhibición del desarrollo vegetativo (Figura 35A); sin embargo recupera un fenotipo normal cuando es sometido a estrés salino (García-Abellán *et al.*, 2015). Con el fin de indagar las bases moleculares del balance desarrollo-defensa que tiene lugar en *res*, se llevó a cabo un análisis global del transcriptoma comparando raíces y hojas de plantas WT y mutantes, en ausencia de estrés (control) y en salinidad (5 días a 200 mM NaCl). Este periodo de estrés salino es suficiente para comenzar a observar la recuperación del fenotipo normal (Figura 35B), además de un aumento significativo del contenido en clorofila y la eficiencia fotosintética (Figura 35C).

El análisis transcriptómico comparativo de *res* vs WT en condición control permitió detectar genes diferencialmente expresados (GDEs) de forma constitutiva entre ambos genotipos, mientras que comparando *res* vs WT en estrés salino se identificaron GDEs en salinidad, que pueden incluir genes con diferencias constitutivas o no. Además, se comparó cada genotipo en estrés salino vs control para identificar transcritos alterados específicamente por la salinidad. En la Figura 36 se presenta un resumen de las diferencias observadas al comparar el transcriptoma de plantas WT y *res* en control y estrés salino. En primer lugar, se observaron diferencias de expresión notables entre la raíz de WT y la de *res* en control (3046 GDEs), mientras que solo 295 GDEs (aproximadamente un 10%) fueron detectados cuando se compararon raíces sometidas a estrés salino (Figura 36A). Por otro lado, el número de GDEs en hoja fue ligeramente menor en control que en estrés salino (1019 y 1366 GDEs, respectivamente), de los cuales solo 241 (un 20% aproximadamente) resultaron comunes a ambas condiciones. Estos resultados indican que el estrés salino redujo considerablemente el número de GDEs entre la raíz de WT y la del mutante, mientras que en hoja cada condición alteró específicamente distintos grupos de genes, siendo sensiblemente mayor el número de GDEs en hojas sometidas a estrés salino. Además, la mayoría de los GDEs resultaron ser específicos para cada tejido (Figura 36B).

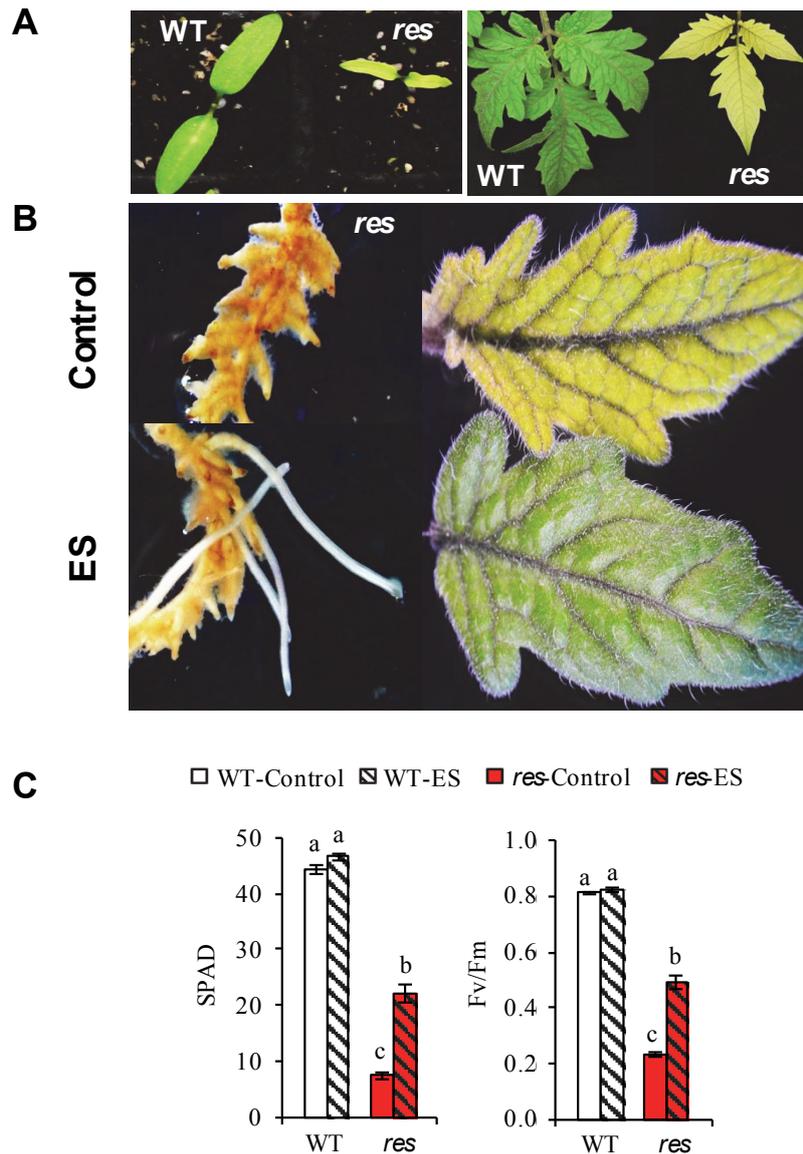


Figura 35. Normalización del fenotipo del mutante *res*. **(A)** Comparación de plántulas de WT y *res* (izquierda) y hojas de plantas adultas (derecha) en condiciones control. **(B)** Cambios fenotípicos en raíces y hojas de *res* causados por el estrés salino, ES (5 días a 200 mM NaCl). **(C)** Contenido de clorofila (SPAD) y eficiencia fotosintética (Fv/Fm) en hojas de plantas WT (barras blancas) y *res* (barras rojas) en control (barras lisas) y estrés salino (barras rayadas). Los datos corresponden a la media \pm error estándar de tres replicas biológicas. Las letras sobre las barras indican diferencias significativas entre medias determinadas mediante test LSD ($P < 0.05$).

La clasificación funcional de los GDEs se llevó a cabo mediante el programa Mapman (Thimm *et al.*, 2004), y las categorías funcionales con el mayor número de GDEs entre *res* y WT incluyeron genes de función desconocida, factores de transcripción, metabolismo proteico y señalización tanto en raíz como en hoja (Figura 36C).

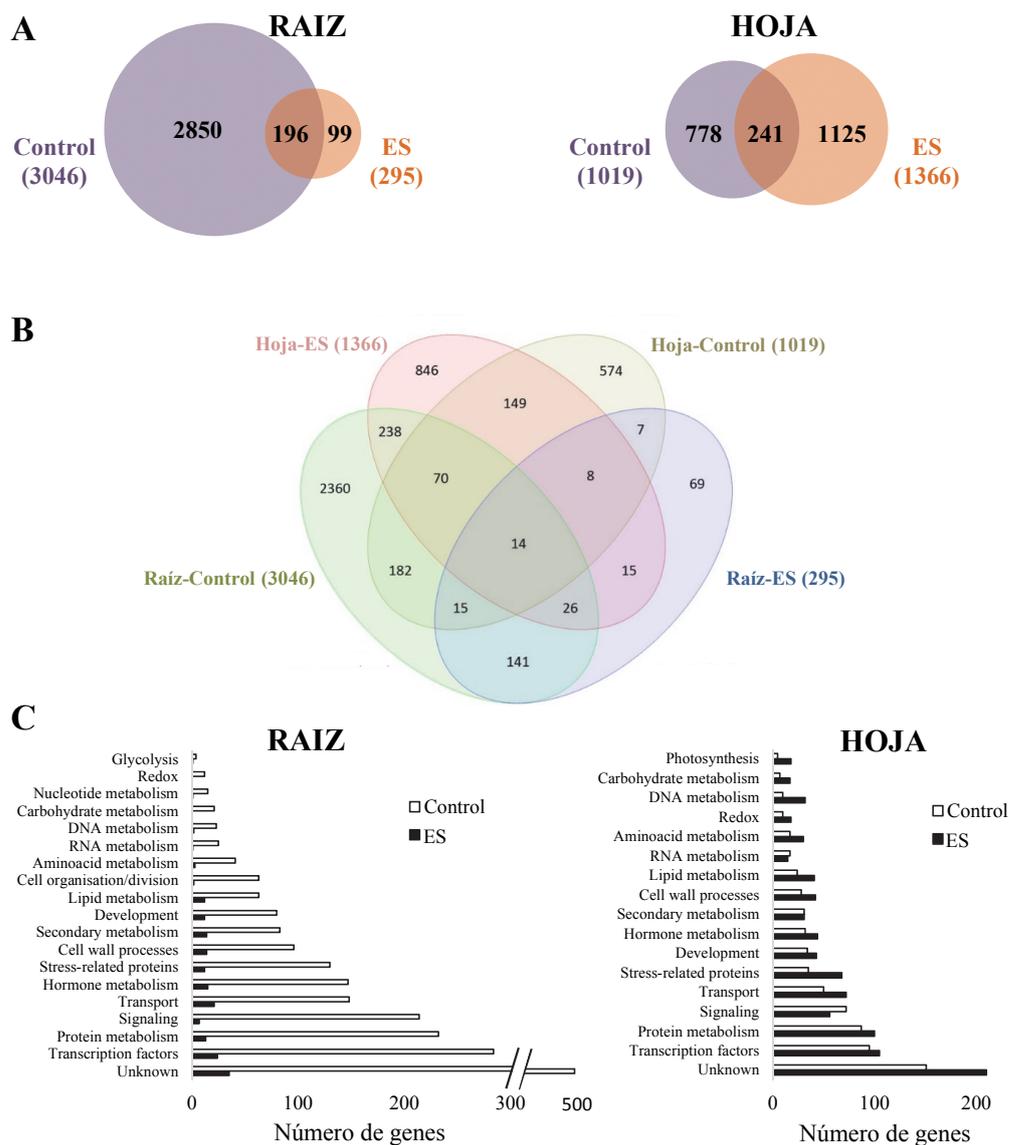


Figura 36. Resumen del análisis transcriptómico comparativo entre WT y *res* en cada condición. **(A)** Diagramas de Venn mostrando el número de genes diferencialmente expresados (GDEs) entre WT y *res* en ausencia de estrés (control) y en estrés salino (ES, 5 días a 200 mM NaCl), así como los solapantes en ambos tratamientos. Los números entre paréntesis indican el número total de GDEs en control y estrés salino para cada tejido. Se consideraron GDEs aquellos con $FDR < 0.05$ y un valor mínimo absoluto de fold-change de 2,0. **(B)** Diagrama de Venn de cuatro vías que establece la relación de los GDEs entre WT y *res* considerando simultáneamente ambos tejidos y tratamientos. Hoja-Control y Raíz-Control incluyen GDEs entre WT y *res* en cada tejido en ausencia de estrés, mientras que Hoja-ES y Raíz-ES representan los GDEs entre ambos genotipos en estrés salino para cada tejido. **(C)** Clasificación de Mapman de las categorías funcionales con mayor número de genes diferencialmente expresados (GDEs) entre plantas WT y *res*, tanto en ausencia de estrés (control, barras blancas) como en estrés salino (200 mM NaCl durante 5 días) (ES, barras negras).

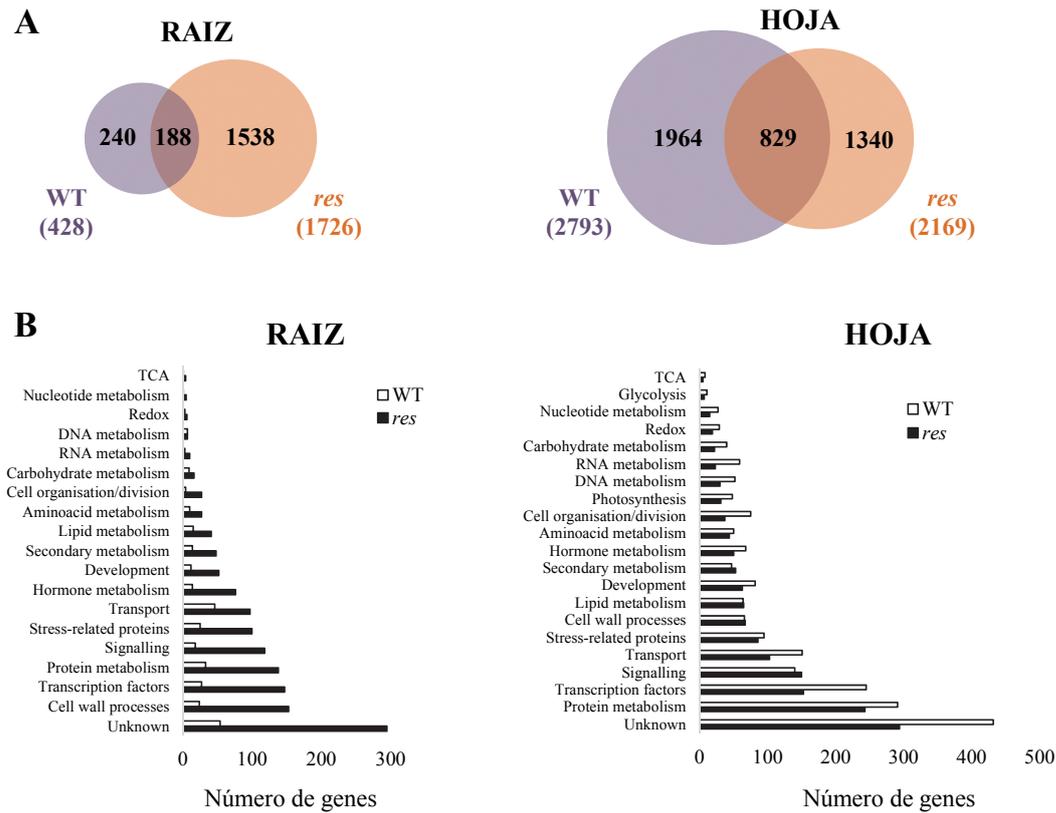


Figura 37. Resumen del análisis transcriptómico comparativo entre estrés salino y control para cada especie. **(A)** Diagramas de Venn mostrando el número de genes diferencialmente expresados (GDEs) en cada genotipo al comparar estrés salino vs control. Los números entre paréntesis indican el número total de GDEs para cada genotipo. **(B)** Clasificación de Mapman de las categorías funcionales con mayor número de genes diferencialmente expresados (GDEs) en estrés salino respecto a control, en plantas WT (barras blancas) y *res* (barras negras).

Al comparar cada genotipo en estrés salino vs control, se encontraron diferencias significativas en la magnitud de la respuesta en la raíz de plantas WT y *res*. Así, se detectaron 1726 GDEs en raíces del mutante en estrés salino vs control, y 428 GDEs en WT (Figura 37A). Por otra parte, se detectaron 2793 GDEs cuando se compararon hojas de WT sometidas a estrés salino con hojas control, y 2169 GDEs en *res* para la misma comparación, de los cuales más del 50% se detectaron específicamente en cada genotipo (Figura 37A). Además, en la clasificación funcional de los GDEs mediante Mapman, la mayoría de las categorías funcionales con el mayor número de GDEs entre estrés salino y control coincidieron con las detectadas al considerar la comparación entre genotipos para cada condición (Figura 37B). Mediante la representación de GDEs en diagramas de Mapman se observó que las categorías funcionales más alteradas estaban integradas en la respuesta a estrés (Figura 38).

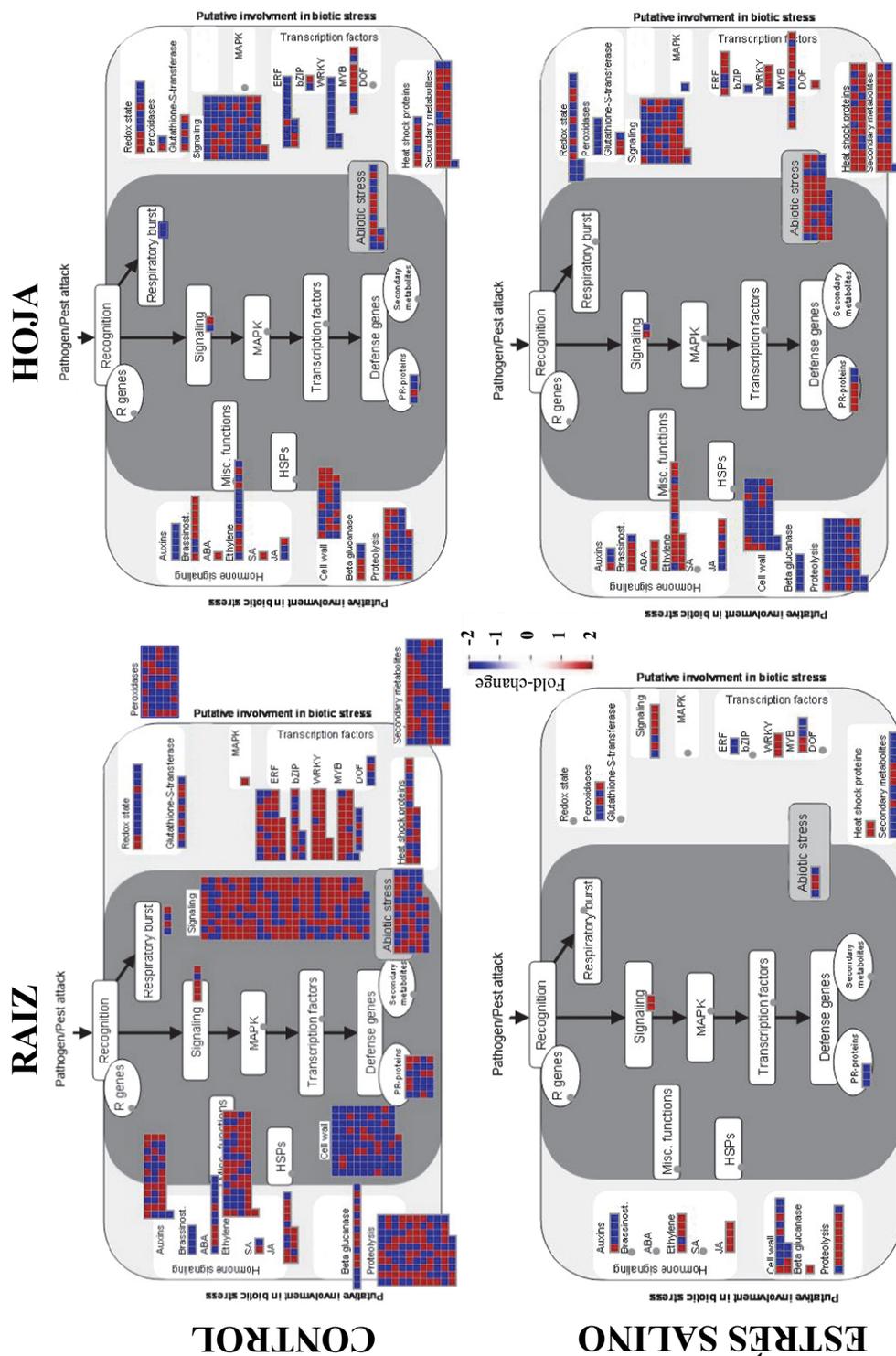


Figura 38. Diagramas de estrés representados por el programa Mapman, los cuales ilustran los genes diferencialmente expresados entre WT y *res* en hojas y raíces control y tratadas con 100 mM NaCl durante 5 días (estrés salino). Los valores positivos de fold-change (en rojo) indican activación en *res* respecto a WT en cada condición, mientras que los valores de fold-change negativos (azul) indican represión (valor mínimo absoluto de fold-change=-2,0). Cada cuadrado coloreado representa un único gen diferencialmente expresado.

A continuación, se presentan distintas tablas que incluyen los genes con mayores cambios de expresión para cada categoría funcional seleccionada.

3.1.1. Genes relacionados con el metabolismo de hormonas y rutas de señalización

Entre las categorías de genes altamente representados en el análisis transcriptómico comparativo, encontramos aquellos relacionados con el metabolismo de hormonas, siendo los de jasmonato (JA) y etileno (ET) los que presentaron las mayores diferencias de expresión entre *res* y WT (Tabla 18). En raíz, los genes involucrados en la síntesis de JA (*AOS*, *LOX*) y señalización (*JAZ*) estaban sobreexpresados en *res vs* WT cuando las plantas se cultivaban en control, mientras que estas diferencias de expresión generalmente se redujeron en estrés salino. En cuanto a ET, mientras que en raíz no se observó una tendencia clara para los genes de biosíntesis, un número considerable de genes que codifican *ETHYLENE RESPONSE FACTORS (ERFs)* estaban activados de forma constitutiva en el mutante. En hoja, por otro lado, la mayoría de genes relacionados con el metabolismo de ET estaban constitutivamente inhibidos en el mutante. Finalmente, tanto en raíz como en hoja, la mayoría de las diferencias de expresión se redujeron considerablemente e incluso desaparecieron durante el tratamiento salino (Tabla 18).

El perfil de expresión de genes implicados en rutas de señalización difirió significativamente entre raíces y hojas en plantas control, ya que la mayoría de los genes sobreexpresados en las raíces de *res vs* WT estaban inhibidos en las hojas (Tabla 19). Entre los genes inducidos en las raíces de *res* en control, observamos un grupo de proteínas de unión a Ca^{2+} : calmodulinas, calreticulinas, ATPasas transportadoras de Ca^{2+} y un gran número de kinasas (*receptor-like kinases*, RLKs). Por ejemplo, Solyc03g118810.1.1 y Solyc11g071740.1.1, que codifican para una calmodulina y una proteína similar a calmodulina, respectivamente, y dos genes *LRR receptor-like serine/threonine protein kinase* (Solyc07g006480.2.1 y Solyc12g009770.1.1) estaban sobreexpresados en raíces e inhibidos en hojas de *res* respecto a WT en control (Tabla 19). Sin embargo, algunos genes muestran la respuesta opuesta, como el gen *GUANYLATE-BINDING PROTEIN 1*, clasificado por Mapman como posiblemente involucrado en la señalización mediada por proteína G, el cual estaba sobreexpresado en hojas de *res vs* WT, no solo en control sino también en estrés salino. En estas condiciones, la mayoría de las diferencias de expresión entre *res* y WT se redujeron

Capítulo II. Resultados

significativamente en ambos tejidos, aunque en raíces se debía principalmente a los cambios de expresión del mutante al comparar sal vs control, mientras que en hojas se debía a cambios de expresión inducidos en el mutante, en WT, o en ambos genotipos.

Tabla 18. Genes implicados en el metabolismo de hormonas. Conjunto representativo de genes que presentan diferencias de expresión significativas en raíces y hojas de plantas *res* y WT en ausencia de estrés (control) y tras 5 días de tratamiento con 200 mM NaCl (estrés salino, ES). En la tabla se muestran los valores de fold-change, comparando *res* con WT en cada tratamiento (primera y segunda columna desde la izquierda) y estrés salino respecto a control para cada genotipo (primera y segunda columna desde la derecha). Los valores de fold-change se acompañan de una escala de color, donde el azul representa inhibición y el rojo activación para cada comparación.

Tejido	ID transcrito	Ruta	<i>res</i> vs WT		ES vs Control		Anotación	
			Control	ES	<i>res</i>	WT		
RAÍZ	JASMONATO							
	Solyc04g079730.1.1	Biosíntesis	26,0	8,5	-	-	AOS	
	Solyc10g007960.1.1	Biosíntesis	11,3	32,5	3,7	-	AOS	
	Solyc03g122340.2.1	Biosíntesis	5,2	-	-2,5	-	LOX3	
	Solyc12g009220.1.1	Señalización	14,1	5,2	-	-	JAZ1	
	Solyc03g122190.2.1	Señalización	10,9	4,0	-	-	JAZ2	
	ETILENO							
	Solyc07g026650.2.1	Biosíntesis	28,4	-	-2,9	-	ACO1	
	Solyc12g006380.1.1	Biosíntesis	10,3	4,1	-	-	ACO-like	
	Solyc11g010400.1.1	Biosíntesis	-39,7	-	3,4	-	ACO2	
	Solyc02g070080.2.1	Biosíntesis	-16,1	-	6,5	-	ACO1	
	Solyc06g073580.2.1	Biosíntesis	-10,5	-	3,7	-	ACO1	
	Solyc11g010410.1.1	Biosíntesis	-8,5	-2,1	-	-	ACO1	
	Solyc06g060070.2.1	Biosíntesis	-5,1	-	-	-	ACO-like	
	Solyc03g118190.2.1	Señalización	23,6	-	-2,2	-	ERF2a	
	Solyc04g071770.2.1	Señalización	19,7	-	-3,5	-	ERF2a	
	Solyc08g007830.1.1	Señalización	18,8	-	-25,3	-	ERF10	
	Solyc09g066360.1.1	Señalización	16,7	-	-15,9	-	ERF2	
	Solyc08g078180.1.1	Señalización	15,7	-	-10,6	-	ERF1a	
HOJA	JASMONATO							
	Solyc08g029000.2.1	Biosíntesis	-11,1	-	-2,9	-	LOX1	
	Solyc11g032220.1.1	Biosíntesis	-	2,4	2,1	-	OPR2	
	Solyc04g079730.1.1	Biosíntesis	-	2,3	4,2	-	AOS	
	Solyc12g049400.1.1	Señalización	6,2	-	-2,8	-	TIFY 3B (JAZ2-like)	
	Solyc12g009220.1.1	Señalización	-3,1	-	-	-6,0	JAZ1	
	ETILENO							
	Solyc08g008100.2.1	Biosíntesis	-6,6	-	-	-7,6	ACS1	
	Solyc02g071380.2.1	Biosíntesis	-	7,3	-	-8,1	ACO3	
	Solyc03g124110.1.1	Señalización	-52,8	-	-	-35,5	CRT binding factor 2	
	Solyc08g007820.1.1	Señalización	-40,3	2,5	2,4	-38,7	ERF10	
	Solyc08g007830.1.1	Señalización	-29,1	-	-	-19,1	ERF10	
	Solyc03g026280.2.1	Señalización	-19,7	-	-	-17,6	CRT binding factor 2	
	Solyc05g052040.1.1	Señalización	-14,4	2,3	4,7	-	AP2	
Solyc03g093610.1.1	Señalización	-6,2	-	-	-7,2	ERF1b		



Tabla 19. Conjunto representativo de genes implicados en rutas de señalización que presentan diferencias de expresión significativas en raíces y/o hojas de plantas *res* y WT en ausencia de estrés (control) y tras 5 días de tratamiento con 200 mM NaCl (estrés salino, ES). En la tabla se muestran los valores de fold-change, comparando *res* con WT en cada tratamiento (primera y segunda columna por la izquierda) y estrés salino respecto a control para cada genotipo (primera y segunda columna por la derecha). Los valores de fold-change se acompañan de una escala de color, donde el azul y el rojo representan inhibición y activación, respectivamente, para cada comparación.

Tejido	ID transcrito	<i>res</i> vs WT		ES vs Control		Anotación
		Control	ES	<i>res</i>	WT	
RAÍZ	Solyc11g071740.1.1	7,3	-	-13,9	-	Calmodulin-like protein
	Solyc03g118810.1.1	7,2	-	-3,6	-	Calmodulin
	Solyc03g044900.2.1	6,9	-	-	-	Calmodulin-like protein 41
	Solyc07g040710.2.1	6,5	-	-9,2	-	Calmodulin-binding protein
	Solyc04g048900.2.1	7,5	2,6	-2,3	-	Calreticulin 2 calcium-binding protein
	Solyc09g082890.1.1	15,4	-	-2,9	-	Calcium-transporting ATPase 1
	Solyc09g082870.1.1	14,9	4,6	-3,5	-	Calcium-transporting ATPase 1
	Solyc01g097420.1.1	9,6	3,7	-	-	Calcium ATPase
	Solyc11g011030.1.1	32,3	21,8	-	-	Pto-responsive gene 1 protein
	Solyc04g014400.2.1	27,3	-	-3,0	-	LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase
	Solyc12g013680.1.1	23,4	-	-	-	LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase
	Solyc02g071820.2.1	20,4	-	-2,6	-	Receptor like kinase, RLK
	Solyc07g006770.2.1	14,5	-	-4,3	-	Receptor like kinase, RLK
	Solyc11g007400.1.1	14,5	-	-2,3	-	Receptor like kinase, RLK
	Solyc02g080070.2.1	12,9	-	-	-	Receptor like kinase, RLK
	Solyc07g006480.2.1	12,1	-	-3,9	-	LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase
	Solyc12g009770.1.1	10,9	-	-	-	LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase
	Solyc11g011180.1.1	10,6	-	-2,2	-	LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase
	Solyc02g031790.1.1	10,1	-	-4,3	-	Receptor like kinase, RLK
	Solyc12g009750.1.1	9,7	-	-	-	LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase
Solyc12g009730.1.1	9,7	-	-	-	LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase	
Solyc06g062450.2.1	-17,6	-	-	-6,3	Receptor like kinase	
Solyc03g121230.2.1	-10,2	-	-2,4	-12,0	Receptor like kinase	
HOJA	Solyc11g071740.1.1	-35,3	-	-	-28,3	Calmodulin-like protein
	Solyc03g118810.1.1	-18,6	-	6,2	-3,7	Calmodulin
	Solyc03g119250.2.1	-17,2	-	7,3	-2,8	Calmodulin-binding protein
	Solyc02g094000.1.1	-15,3	-	-	-14,1	Calmodulin-like protein
	Solyc03g112700.1.1	-9,7	-	-	-11,1	Calmodulin-binding protein
	Solyc08g016210.2.1	-23,5	-	3,1	-5,4	LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase
	Solyc04g074020.2.1	-21,0	-	10,6	-2,4	Receptor like kinase, RLK
	Solyc02g068830.1.1	-20,1	-	3,4	-8,9	Receptor like kinase, RLK
	Solyc11g005630.1.1	-12,6	-	12,0	-	Receptor-like protein kinase
	Solyc06g071810.1.1	-8,3	-	5,7	-2,7	Receptor like kinase, RLK
	Solyc07g006480.2.1	-7,3	2,2	4,2	-3,3	LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase
	Solyc12g009770.1.1	-6,5	-	10,1	-	LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase
	Solyc12g100030.1.1	-	-11,3	-	-	LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase
	Solyc02g079550.1.1	-	-12,6	-	14,6	Serine/threonine kinase receptor
	Solyc02g079560.1.1	-	-7,3	-	-	Receptor-like protein kinase
	Solyc05g041770.1.1	30,8	17,1	-	-	Guanylate binding protein 1
	Solyc01g109110.2.1	-16,9	-	6,4	-4,3	Guanine nucleotide-binding protein α -1 subunit



3.1.2. Genes que codifican factores de transcripción y proteínas de estrés

En raíces no sometidas a estrés, los factores de transcripción (TFs) sobreexpresados en el mutante *res* respecto a WT incluyeron un grupo significativo de WRKYs y MYBs, mientras que en estrés salino se redujeron considerablemente las diferencias de expresión, en gran parte debido a una inhibición específica de estos genes en las raíces de *res* en salinidad (Tabla 20). En hojas, también se observó una sobreexpresión de MYBs en *res* respecto a WT y algunos de ellos, como *SIMYB48* y *ARS1*, son específicos de estrés salino. Por el contrario, los WRKYs mostraron tendencias de expresión opuestas a las observadas en raíces (por ejemplo, *SIWRKY39*).

Otro grupo de genes detectados específicamente en hojas al comparar *res* vs WT en medio salino corresponden a genes implicados en el ciclo circadiano (Tabla 20). Es interesante señalar que solo el gen *MYB-like CIRCADIAN CLOCK ASSOCIATED 1 (CCAI)* tenía mayor expresión en *res* que en WT, mientras que los demás estaban fuertemente inhibidos en *res*, incluido el gen *GIGANTEA1*.

En cuanto a los GDEs que codifican proteínas relacionadas con el estrés, se detectaron algunos de proteínas de transferencia de lípidos (*lipid transfer proteins*, LTPs) en raíces y hojas del mutante respecto a WT en ausencia de estrés, y la mayoría estaban constitutivamente activados en ambos tejidos del mutante (Tabla 21). Otros genes constitutivamente activados en *res* en ausencia de estrés incluyeron quitinasas y proteínas asociadas a patógenos (*pathogenesis-related proteins*, PRs), mientras que se detectaron otros genes asociados a estrés biótico inhibidos en las raíces del mutante. En hojas, el número de GDEs entre *res* y WT de proteínas relacionadas con el estrés fue mayor en estrés salino que en control (Figura 37A), y entre los genes específicamente activados en estrés en el mutante respecto a WT se encontraron algunas HEAT SHOCK PROTEINS (HSPs) (Tabla 21).

Tabla 20. Conjunto representativo de genes que codifican factores de transcripción con diferencias de expresión significativas en raíces y hojas de *res* y WT en ausencia de estrés (control) y tras 5 días de tratamiento con 200 mM NaCl (ES). En la tabla se muestran los valores de fold-change para la comparación de *res* con WT en cada tratamiento (primera y segunda columna desde la izquierda) y estrés salino con control para cada genotipo (primera y segunda columna desde la derecha). Los valores de fold-change se acompañan de una escala de color, donde el azul representa inhibición y el rojo activación para cada comparación.

Tejido	ID transcrito	<i>res</i> vs WT		ES vs Control		Anotación
		Control	ES	<i>res</i>	WT	
RAÍZ	Solyc07g056280.2.1	28,4	9,0	-2,4	-	SIWRKY-30
	Solyc05g015850.2.1	22,5	-	-3,9	-	SIWRKY-75
	Solyc03g116890.2.1	13,3	2,3	-4,4	-	SIWRKY-39
	Solyc03g007380.1.1	10,7	-	-3,6	-	SIWRKY-52
	Solyc01g079260.2.1	7,9	-	-	-	SIWRKY-23
	Solyc04g051690.2.1	7,0	-	-	-	SIWRKY-51
	Solyc02g071130.2.1	5,1	-	-	-	SIWRKY-71
	Solyc12g099140.1.1	20,9	-	-5,7	-	SIMYB-108
	Solyc03g119370.1.1	14,2	-	-3,3	-	SIMYB-116
	Solyc06g083900.2.1	9,6	12,5	-	-	SIMYB-14
	Solyc03g093930.2.1	8,6	-	-3,0	-	SIMYB-63
	Solyc12g008670.1.1	7,4	-	-5,6	-	SIMYB-38
	Solyc09g090130.2.1	6,2	2,8	-3,4	-	SIMYB-13
	Solyc03g093940.1.1	5,8	-	-3,9	-	SIMYB-81
	Solyc05g053330.2.1	5,8	-	-2,9	-	SIMYB-2
	Solyc03g093890.2.1	5,2	-	-3,9	-	SIMYB-58
HOJA	Solyc08g082110.2.1	-63,6	-	6,0	-14,2	SIWRKY-54
	Solyc09g014990.2.1	-49,7	2,1	6,9	-11,3	SIWRKY-33
	Solyc08g008280.2.1	-48,8	-	9,8	-12,4	SIWRKY-53
	Solyc04g051690.2.1	-8,3	-	-	-5,7	SIWRKY-51
	Solyc06g066370.2.1	-7,8	-	3,8	-2,5	SIWRKY-31
	Solyc06g068460.2.1	-6,1	-	2,5	-3,5	SIWRKY-40
	Solyc08g067340.2.1	-5,9	-	14,1	4,1	SIWRKY-46
	Solyc03g116890.2.1	-5,1	6,8	2,3	-14,4	SIWRKY-39
	Solyc01g079260.2.1	-	3,8	-	-4,9	SIWRKY-23
	Solyc06g083900.2.1	30,3	7,6	-5,0	-	SIMYB-14
	Solyc12g008800.1.1	10,0	-	-2,3	2,5	MYB transcription factor
	Solyc04g005600.1.1	6,4	-	-6,5	-	SIMYB-51
	Solyc06g065100.2.1	5,6	-	-	4,7	SIMYB-3
	Solyc03g098320.2.1	-	17,8	-	-45,7	MYB transcription factor
	Solyc11g073120.1.1	-	7,5	-	-8,3	SIMYB-48
	Solyc01g095030.2.1	-	5,0	-	-7,0	MYB transcription factor ARS1
	Solyc10g005080.2.1	-	36,2	-2,4	-131,9	Circadian clock associated-1, CCA1
	Solyc06g051680.1.1	-	-133,9	-	-	ELF4-like protein
	Solyc03g081240.2.1	-	-66,6	-	74,6	Pseudo response regulator
	Solyc01g006680.2.1	-	-56,9	-	54,4	jumonji jmjC domain protein
Solyc01g005300.2.1	-	-44,0	-	36,0	FKF-1 - Flavin-binding kelch domain F box	
Solyc03g115770.2.1	-	-21,1	-	5,0	Timing of CAB expression-like, TOC1-like	
Solyc05g024010.2.1	-	-17,9	-	46,3	CONSTANS-like zinc finger protein	
Solyc04g071990.2.1	-	-15,2	-	44,9	Tomato GIGANTEA 1	



Capítulo II. Resultados

Tabla 21. Conjunto representativo de genes de proteínas relacionadas con estrés que presentan diferencias de expresión significativas en raíces y hojas de *res* y WT en ausencia de estrés (control) y tras 5 días de tratamiento con 200 mM NaCl (ES). En la tabla se muestran los valores de fold-change para la comparación de *res* con WT en cada tratamiento (primera y segunda columna desde la izquierda) y estrés salino con control para cada genotipo (primera y segunda columna desde la derecha). Los valores de fold-change se acompañan de una escala de color, donde el azul representa inhibición y el rojo activación para cada comparación.

Tejido	ID transcrito	<i>res</i> vs WT		ES vs Control		Anotación
		Control	ES	<i>res</i>	WT	
RAÍZ	Solyc09g082280.2.1	32,3	-11,6	-	517,1	Non-specific lipid-transfer protein
	Solyc03g083990.1.1	23,9	-	-20,0	-	Plant lipid transfer protein
	Solyc12g014630.1.1	17,1	9,6	-	-	Plant lipid transfer protein
	Solyc12g014620.1.1	10,3	-	-	-	Plant lipid transfer protein
	Solyc03g005200.2.1	-8,1	-	-	-	Plant lipid transfer protein
	Solyc06g054060.1.1	-	-10,6	-	-	Non-specific lipid-transfer protein
	Solyc09g065430.2.1	-	-6,2	-	7,2	Non-specific lipid-transfer protein
	Solyc03g005210.2.1	-	-6,1	-	-	Non-specific lipid-transfer protein
	Solyc07g009510.1.1	72,5	-	-2,2	61,8	Chitinase
	Solyc07g009500.1.1	70,0	-	-	99,7	Chitinase
	Solyc09g007010.1.1	20,5	-	-6,9	-	Pathogenesis related protein PR-1
	Solyc02g082920.2.1	15,5	-	-	18,3	Endochitinase
	Solyc01g106600.2.1	10,0	-	-3,5	-	Pathogenesis-related protein 1
	Solyc05g050130.2.1	8,1	-	-	-	Chitinase
	Solyc07g006710.1.1	-7,7	-	7,1	-	Pathogenesis-related protein PR-1
	Solyc07g054780.1.1	32,2	-	-	-	Wound induced protein
	Solyc07g052780.2.1	21,1	-	-4,7	-	Tir, resistance protein
	Solyc02g082740.1.1	13,5	-	-	-	Plant disease resistance response protein
	Solyc12g097000.1.1	9,9	-	-2,5	-	Tir, resistance protein
	Solyc07g054760.1.1	8,6	-	-	-	Wound induced protein
	Solyc12g094660.1.1	6,0	-	-2,0	-	Cc-nbs-Irr, resistance protein
	Solyc02g032030.1.1	-14,1	-	-	-3,7	Plant disease resistance response protein
	Solyc12g097090.1.1	-13,5	-	2,8	-	Plant disease resistance response protein
	Solyc08g081780.1.1	-12,0	-	5,9	-	Plant disease resistance response protein
	Solyc10g055190.1.1	-11,8	-	-	-3,4	Plant disease resistance response protein
	Solyc01g107540.2.1	-10,1	-4,6	-	-2,5	PBSP domain-containing protein
Solyc04g010270.1.1	-7,0	-	2,8	-	Plant disease resistance response protein	
Solyc09g091210.2.1	-6,2	-	-	-	Plant disease resistance response protein	
Solyc10g086680.1.1	6,7	-	-3,6	-	Class I heat shock protein	
HOJA	Solyc10g075070.1.1	10,7	-	2,5	9,3	Non-specific lipid-transfer protein
	Solyc08g067530.1.1	7,7	-	-	-	Non-specific lipid-transfer protein
	Solyc10g075090.1.1	6,6	-	8,7	32,4	Non-specific lipid-transfer protein
	Solyc08g005960.1.1	-	-16,1	4,2	62,0	Plant lipid transfer protein
	Solyc08g080640.1.1	-12,0	-4,7	-	-	Osmotin-like protein
	Solyc08g080650.1.1	-8,1	-3,0	3,3	-	Osmotin-like protein
	Solyc07g006560.2.1	60,3	-	-	-	Hypersensitive response assisting protein
	Solyc01g095320.2.1	7,6	-	6,9	47,0	Apoptosis regulator Bcl-2 protein
	Solyc01g102840.2.1	-7,7	-	2,0	-5,8	Tir-nbs, resistance protein fragment
	Solyc04g007320.1.1	-6,8	-	4,1	-2,9	Tir-nbs-Irr, resistance protein
	Solyc07g054760.1.1	-	7,3	-	-	Wound induced protein
	Solyc06g036290.2.1	-	12,1	-	-	Heat shock protein 90
	Solyc11g066100.1.1	-	8,5	-	-	Heat shock protein 70
	Solyc03g123560.2.1	-	7,5	-	-4,5	Heat shock protein 40
	Solyc06g068500.2.1	-	-6,8	-	6,7	Heat shock protein DnaJ
	Solyc09g092260.2.1	-	-6,4	-	6,3	Heat shock protein DnaJ



3.1.3. Genes implicados en el metabolismo de proteínas

En control, se detectó la sobreexpresión en raíces y hojas de *res* vs WT de un gran número de genes implicados en la degradación de proteínas (proteasas) y su regulación (inhibidores de proteasas, PIs), incluyendo componentes del complejo ubiquitina-proteasoma, observándose las mayores diferencias de expresión en los PIs (Tabla 22). Mientras que los GDEs de proteasas se redujeron en raíces sometidas a estrés salino, algunos PIs mostraron valores de sobreexpresión mayores en salinidad que en control, especialmente el gen *KUNITZ-TYPE PROTEINASE INHIBITOR A4*. Además, otros PIs se sobreexpresaron en las raíces de *res* específicamente en estrés salino, por ejemplo el gen *METALLOCARBOXYPEPTIDASE INHIBITOR (MPI)* (Solyc07g007250.2.1). Además, fue precisamente este gen el más sobreexpresado en las hojas de *res* en control. También es interesante señalar que algunos PIs detectados están codificados por *loci* adyacentes en el mismo cromosoma (Solyc03g098710, Solyc03g098720, etc.) (Tabla 22).

3.1.4. Genes implicados en el desarrollo vegetal, la fotosíntesis y el metabolismo energético

Un número considerable de genes implicados en procesos de desarrollo, modificación de la pared celular y ciclo celular estaban inhibidos en raíces y hojas de *res* respecto a WT en ausencia de estrés (Tabla 23), en consonancia con las importantes alteraciones en el desarrollo del mutante. Sin embargo, las diferencias de expresión en estos genes en raíces se redujeron significativamente en estrés salino, coincidiendo con la normalización del fenotipo mutante (Figura 35B, C). La reducción de GDEs entre *res* y WT en estrés salino se debió principalmente a la activación de genes anteriormente reprimidos en las raíces de *res*, aunque en algunos casos también se observó una reducción de la expresión génica por la salinidad en WT.

Capítulo II. Resultados

Tabla 22. Conjunto representativo de genes implicados en el metabolismo de proteínas que presentan diferencias de expresión significativas en raíces y/o hojas de plantas *res* y WT en ausencia de estrés (control) y tras 5 días de tratamiento con 200 mM NaCl (estrés salino, ES). En la tabla se muestran los valores de fold-change, comparando *res* con WT en cada tratamiento (primera y segunda columna por la izquierda) y estrés salino respecto a control para cada genotipo (primera y segunda columna por la derecha). Los valores de fold-change se acompañan de una escala de color, donde el azul y el rojo representan inhibición y activación, respectivamente, para cada comparación.

Tejido	ID transcrito	Control	ES	<i>res</i>	WT	Anotación
RAÍZ	INHIBIDORES DE PROTEASAS					
	Solyc00g071180.2.1	58,0	18,0	2,2	-	Cysteine proteinase inhibitor
	Solyc03g098760.1.1	20,2	89,5	4,8	-	Kunitz-type protease inhibitor-like protein
	Solyc03g098740.1.1	19,8	-	-3,2	25,4	Kunitz trypsin inhibitor
	Solyc03g098710.1.1	18,6	189,5	10,1	-	Kunitz-type proteinase inhibitor A4
	Solyc03g098720.2.1	5,3	55,2	7,9	-	Kunitz trypsin inhibitor
	Solyc09g084460.2.1	2,7	103,8	27,9	-	Chymotrypsin inhibitor 2
	Solyc07g007250.2.1	-	36,4	31,3	-	Metalloproteinase inhibitor
	Solyc03g020070.2.1	-	23,6	18,1	-	Proteinase inhibitor II
	Solyc09g084490.2.1	-	19,8	26,2	-	Proteinase inhibitor I
	PROTEASAS / UBIQUITINA-PROTEASOMA					
	Solyc03g033790.2.1	44,1	-	-2,4	-	Cell division protease ftsH homolog 3
	Solyc03g117860.2.1	21,6	4,1	-2,3	-	IBR finger domain protein
	Solyc04g082120.2.1	18,9	-	-2,9	-	Prolyl endopeptidase
	Solyc03g115920.2.1	9,0	-	-	-	Zinc finger protein-like protein
	Solyc03g033330.2.1	8,8	-	-	-	RING finger protein 44
	Solyc03g033840.2.1	7,8	-	-	-	26S protease regulatory subunit 6B homolog
	Solyc03g117270.1.1	6,6	-	-	-	F-box family protein
	Solyc11g006030.1.1	6,0	-	-8,0	-	U-box domain-containing protein
Solyc02g062550.2.1	5,9	-	-4,5	-	Cell division protease ftsH homolog	
Solyc08g007610.1.1	-	5,1	2,0	-	Subtilisin-like protease	
HOJA	INHIBIDORES DE PROTEASAS					
	Solyc07g007250.2.1	265,1	2,9	-5,0	22,4	Metalloproteinase inhibitor
	Solyc03g098790.1.1	102,8	2,8	-6,4	5,0	Kunitz-type protease inhibitor
	Solyc09g083440.2.1	31,5	-	-2,4	32,9	Proteinase inhibitor I
	Solyc11g021060.1.1	29,1	-	-4,5	14,5	Proteinase inhibitor
	Solyc11g022590.1.1	27,4	2,1	-2,6	7,8	Kunitz trypsin inhibitor 4
	Solyc09g084480.2.1	21,7	-	-8,5	-	Proteinase inhibitor I
	Solyc09g084490.2.1	20,5	-	-11,7	-	Proteinase inhibitor I
	Solyc03g098780.1.1	14,3	-	-2,8	5,3	Kunitz-type protease inhibitor
	Solyc01g080020.2.1	3,6	-5,5	-	10,7	Xylanase inhibitor
	Solyc03g098730.1.1	-10,5	-	3,3	-5,8	Kunitz trypsin inhibitor
	Solyc09g089540.2.1	-	-5,6	-	12,7	Proteinase inhibitor I
	PROTEASAS / UBIQUITINA-PROTEASOMA					
	Solyc00g187050.2.1	29,1	-	-4,3	-	Leucyl aminopeptidase
	XM_004248114.1	16,5	-	-	-	Predicted: E3 ubiquitin-protein
Solyc12g010020.1.1	15,9	-	-5,1	3,0	Leucyl aminopeptidase	
Solyc02g076690.2.1	-	-17,5	4,1	40,2	Cathepsin B-like cysteine proteinase	



Tabla 23. Conjunto representativo de genes implicados en procesos de desarrollo, modificación de la pared celular y control del ciclo celular, con diferencias de expresión significativas en raíces y hojas de *res* y WT en ausencia de estrés (control) y tras 5 días de tratamiento con 200 mM NaCl (ES). En la tabla se muestran los valores de fold-change para la comparación de *res* con WT en cada tratamiento (primera y segunda columna desde la izquierda) y estrés salino respecto a control para cada genotipo (primera y segunda columna desde la derecha). Los valores de fold-change se acompañan de una escala de color, donde el azul representa inhibición y el rojo activación para cada comparación.

Tejido	ID transcrito	<i>res</i> vs WT		ES vs Control		Anotación
		Control	ES	<i>res</i>	WT	
RAÍZ	Solyc01g097690.2.1	-214,8	-	10,3	-13,1	Extensin-like protein Dif54
	Solyc01g097680.2.1	-50,6	-	5,1	-14,0	Extensin-like protein Dif10
	Solyc02g030220.1.1	-38,0	-	11,2	-26,5	Extensin-like protein Dif10
	Solyc02g081990.2.1	-25,8	-3,0	9,1	-	Pectinesterase
	Solyc01g005880.1.1	-23,6	-	8,7	-18,5	Extensin-like protein Dif10
	Solyc12g015690.1.1	-9,1	-	4,1	-	Fasciclin-like arabinogalactan protein 10
	Solyc03g116370.2.1	-7,4	-	2,8	-	Microtubule plus-end binding protein
	Solyc10g047240.1.1	-7,4	-	2,5	-	Annexin
	Solyc12g007260.1.1	-5,8	11,1	3,6	-16,2	Xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase 2
	Solyc01g091530.2.1	-5,6	-	2,2	-	Fasciclin-like arabinogalactan protein 13
	Solyc05g054480.2.1	-5,0	-	2,3	-	Actin
	Solyc10g086520.1.1	-	11,2	2,3	-	Expansin-1
HOJA	Solyc07g056000.2.1	-54,7	-	-	-26,9	Xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase 7
	Solyc03g093110.2.1	-36,3	-	-	-34,7	Xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase 9
	Solyc12g017240.1.1	-29,8	-	-	-22,3	Xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase 7
	Solyc11g068620.1.1	-25,4	2,1	-	-10,3	No apical meristem (NAM) protein
	Solyc03g093120.2.1	-18,0	-	-	-14,1	Xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase 9
	Solyc03g097050.2.1	-14,3	-	-	-14,0	Cellulose synthase-like protein



En hojas, se observaron diferencias significativas de expresión entre *res* y WT en genes de fotosíntesis y otros procesos metabólicos relacionados específicamente en estrés salino (Tabla 24). Entre ellos, cabe mencionar algunos componentes de los complejos fotosintéticos, como la subunidad *PsbP* del fotosistema II (PSII), *PGR5*, *FEDA* y *ATP SYNTHASE I-LIKE PROTEIN*, así como dos genes *CHLOROPHYLLIDE A OXYGENASE*, responsables de la síntesis de clorofila b. Además, es interesante mencionar que dos genes que afectan a la eficiencia fotosintética, *RUBISCO ACTIVASE 1 (RCA1)* (Solyc09g011080.2.1) y *ALTERNATIVE OXIDASE 1A (AOX1A)* (Solyc08g075540.2.1), mostraron los mayores valores de sobreexpresión en hojas de *res* comparadas con WT específicamente en estrés salino. En la mayoría de los casos,

estas diferencias se debieron a la inhibición de estos genes en las hojas de WT en salinidad.

Tabla 24. Conjunto representativo de genes implicados en la fotosíntesis y procesos metabólicos relacionados que presentan diferencias de expresión significativas en hojas de plantas *res* y WT en ausencia de estrés (control) y tras 5 días de tratamiento con 200 mM NaCl (estrés salino, ES). En la tabla se muestran los valores de fold-change, comparando *res* con WT en cada tratamiento (primera y segunda columna por la izquierda) y estrés salino respecto a control para cada genotipo (primera y segunda columna por la derecha). Los valores de fold-change se acompañan de una escala de color, donde el azul y el rojo representan inhibición y activación, respectivamente, para cada comparación.

ID transcrito	<i>res</i> vs WT		ES vs Control		Anotación
	Control	ES	<i>res</i>	WT	
Solyc09g011080.2.1	-	19,1	-	-16,3	Ribulose-1 5-bisphosphate carboxylase/oxygenase activase 1
Solyc08g075540.2.1	-	13,1	-	-21,9	Alternative oxidase
Solyc07g005390.2.1	-	5,1	-	-3,9	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)
Solyc09g090570.2.1	-	3,9	-	-6,3	PGR5 - Proton gradient regulation 5
Solyc01g103920.2.1	-	2,7	5,1	-	FED A - Ferredoxin I
Solyc04g064670.2.1	-	2,7	-	-4,6	Mog1/PsbP Thylakoid lumenal 19 kDa protein, chloroplastic
Solyc12g010870.1.1	-	2,4	-	-3,9	ATP synthase I-like protein
Solyc01g008930.2.1	-	2,3	-	-	HY2, GUN3 HY2 (ELONGATED HYPOCOTYL 2)
Solyc06g060310.2.1	-	4,1	-2,7	-13,4	Chlorophyllide a oxygenase
Solyc11g012850.1.1	-	3,2	-	-6,1	Chlorophyllide a oxygenase



3.1.5. Análisis por RT-qPCR de genes seleccionados y validación del microarray

Distintos GDEs fueron seleccionados en raíz y hoja y analizados por RT-qPCR atendiendo a su posible papel relevante en la recuperación del fenotipo normal de *res* y su tolerancia en estrés salino. Entre los GDEs de raíz, se analizaron dos implicados en el metabolismo de JA (*AOS* y *JAZ1*) y uno de señalización (Ca^{2+} -*ATPase*), y se observó una disminución significativa de la expresión de estos genes en las raíces de *res* en estrés salino respecto a control, corroborando los resultados obtenidos en el microarray (Figura 39). En hoja, se analizaron los dos genes relacionados con la eficiencia fotosintética, *RCAI* y *AOX1A*, y los resultados confirmaron la notable activación de estos genes en el mutante respecto a WT en estrés salino. También se analizó la expresión del gen componente del ciclo circadiano *GIGANTEA1* en las hojas de *res* respecto a las de WT y se mantuvo la inhibición por salinidad observada en el microarray (Figura 39).

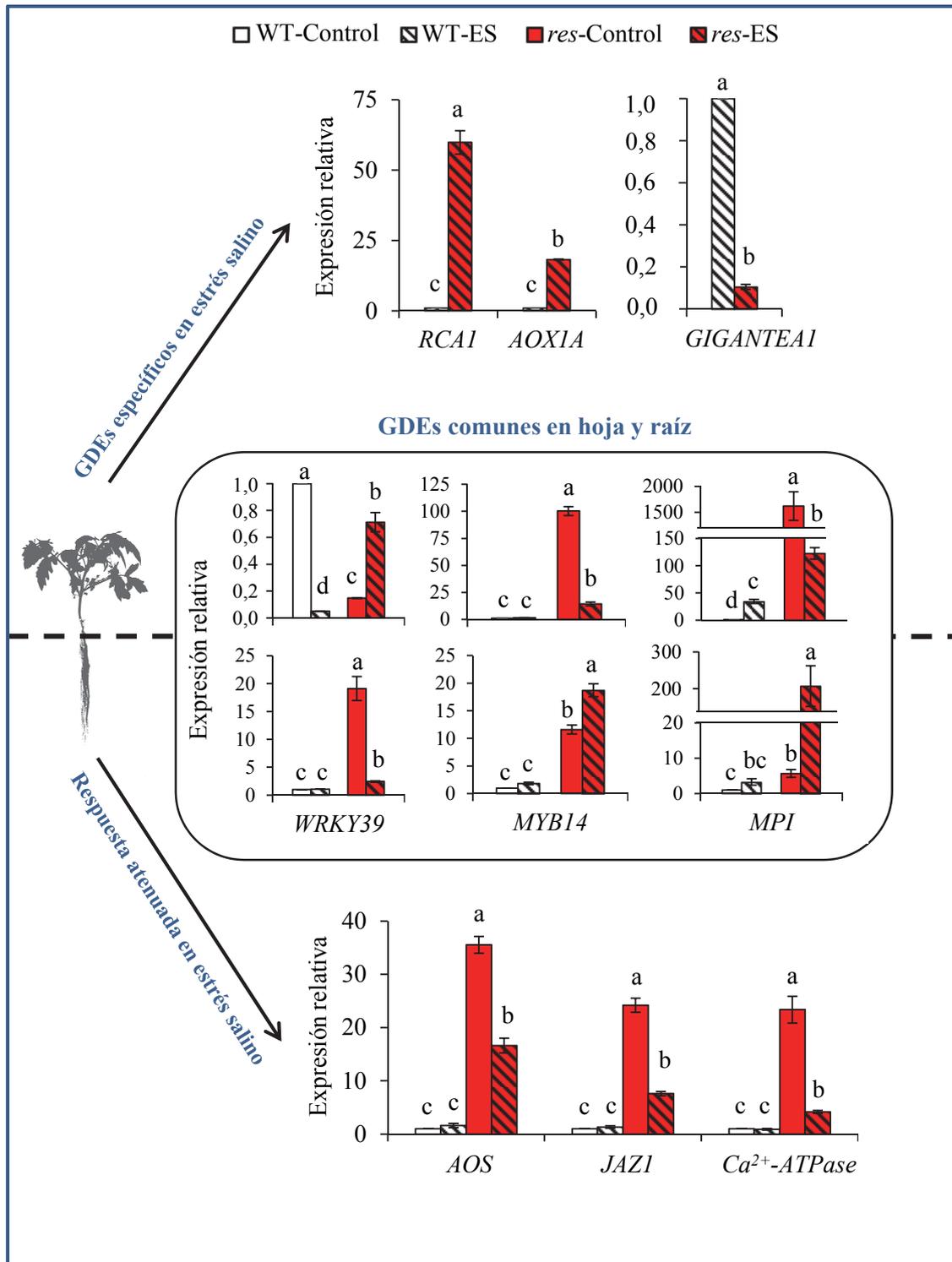


Figura 39. Análisis mediante RT-qPCR de genes diferencialmente expresados (GDEs) relevantes entre *res* y WT en ausencia de estrés (control) y tras 5 días de exposición a 200 mM NaCl (estrés salino). En la mayoría de los casos, se utilizó como muestra de referencia RNA de raíces o folíolos de plantas WT cultivadas en ausencia de estrés, excepto para los genes cuyas diferencias eran específicas de salinidad (*GIGANTEA*, *RCAI* y *AOX1A*), para los que se utilizó como referencia RNA de folíolos de plantas WT sometidas a estrés salino. Los datos corresponden a la media \pm error estándar de tres replicas biológicas. Las distintas letras sobre las barras indican diferencias significativas entre medias determinadas mediante test LSD ($P < 0,05$). *MPI* es abreviatura de *METALLOCARBOXYPEPTIDASE INHIBITOR*.

Respecto a genes comunes en ambos tejidos y condiciones experimentales, se detectaron únicamente 14 GDEs (Figura 36B), y cabe mencionar que entre ellos encontramos los factores de transcripción *WRKY39* y *MYB14*. Los resultados de RT-qPCR indicaron una activación constitutiva de *WRKY39* en las raíces de *res* y su atenuación en estrés salino, de forma similar a la tendencia observada para los genes de JA. Sin embargo, la expresión de *MYB14* fue mayor en la raíz de *res* respecto a WT tanto en control como en salinidad (Figura 39). En hoja, las tendencias de expresión observadas para ambos genes fueron opuestas a las de raíz, ya que la expresión de *WRKY39* aumentó en hojas sometidas a estrés salino respecto a control, mientras que la sobreexpresión constitutiva de *MYB14* en *res* se redujo considerablemente (86%) en salinidad. Otro gen analizado fue el inhibidor de proteasas *MPI*, y los resultados corroboraron la sobreexpresión constitutiva de este gen en hojas de *res*, y también su mayor expresión en las raíces del mutante respecto a WT en estrés salino (Figura 39).

Por último, para completar la validación del análisis por microarray, se analizaron otros GDEs en raíces y hojas mediante RT-qPCR (Figura 40A). Los resultados de expresión génica obtenidos mostraron la misma tendencia para ambas técnicas, y se obtuvo un coeficiente de correlación de Pearson de 0,87 (Figura 40B). En resumen, los resultados de RT-qPCR verificaron la reproducibilidad y fiabilidad del análisis por microarray.

A

ID transcrito	Anotación	Tejido	Genotipo/Tratamiento	Expresión relativa ($2^{-\Delta\Delta Ct}$)
Solyc06g0668302.1	GA20OX-2	Raíz	<i>res</i> (control)	0,04 ± 0,01
			WT (control)	1,00 ± 0,00
Solyc12g089380.1.1	Expansin	Raíz	<i>res</i> (control)	0,05 ± 0,01
			WT (control)	1,00 ± 0,00
Solyc02g030220.1.1	Extensin	Raíz	<i>res</i> (control)	0,02 ± 0,00
			WT (control)	1,00 ± 0,00
Solyc09g082280.2.1	ns-LTP	Raíz	<i>res</i> (control)	414,01 ± 73,68
			WT (control)	1,00 ± 0,00
			<i>res</i> (estrés salino)	566,88 ± 71,74
			WT (estrés salino)	15764,53 ± 144,24
Solyc05g041770.1.1	Guanylate-binding protein 1	Hoja	<i>res</i> (control)	25,05 ± 1,79
			WT (control)	1,00 ± 0,00
			<i>res</i> (estrés salino)	17,67 ± 1,88
			WT (estrés salino)	1,33 ± 0,15

B

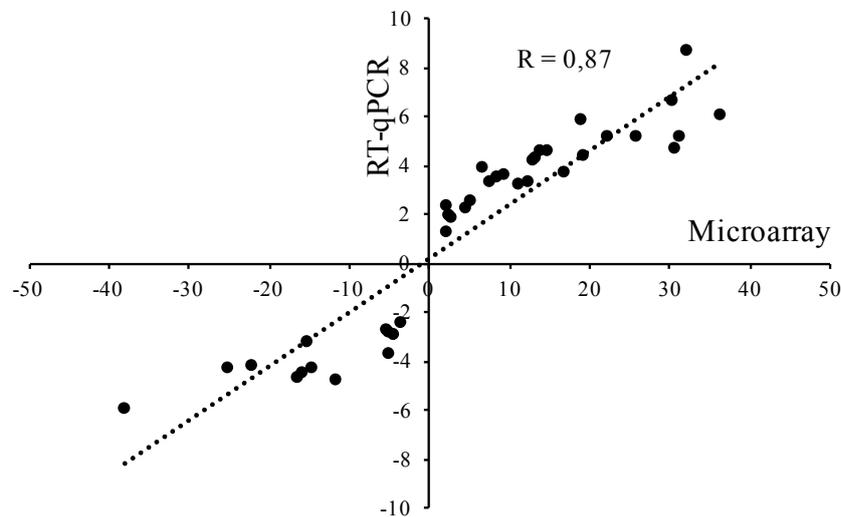


Figura 40. Validación del análisis microarray. **(A)** Genes seleccionados para completar la validación, además de los mostrados en la Figura 39, y valores de expresión relativa obtenidos por RT-qPCR mediante el método $\Delta\Delta Ct$, utilizando como muestra de referencia RNA de raíces o folíolos de plantas WT cultivadas en ausencia de estrés. Los resultados se expresan como valor medio \pm error estándar de tres réplicas biológicas. **(B)** Análisis de correlación entre los datos del microarray (eje x) y RT-qPCR (eje y). Los valores de expresión relativa obtenidos mediante el análisis microarray se compararon con los resultados de RT-qPCR, obteniéndose un coeficiente de correlación de Pearson (R) de 0,87 (n=39).

3.2. Identificación y análisis funcional del gen alterado en el mutante *res*

3.2.1. Identificación del gen *RES*

El mutante de tomate *res* se identificó en el escrutinio de la colección de mutantes insercionales de T-DNA generada a partir del cultivar MoneyMaker. Sin embargo, en su caso se demostró que el fenotipo mutante (recesivo) no estaba asociado a un inserto T-DNA, siendo considerado un mutante de origen somaclonal (García-Abellán *et al.*, 2015). Las notables alteraciones morfológicas y fisiológicas del mutante ofrecen un fenotipo robusto que debería posibilitar el mapeo fino del locus *RES*. Para ello, se generó una población segregante (F2) a partir del cruce entre una planta de fenotipo *res* acigota para el T-DNA y una planta de *S. pimpinellifolium* accesión LA1589. En la población F2, 252 plantas mostraron un fenotipo WT mientras que 71 mostraron el fenotipo mutante. Estos resultados apoyaron la hipótesis de una herencia monogénica y recesiva de la mutación *res* (test Chi-cuadrado $\chi^2=1,57$, $P=0,21$). Este material fue utilizado por el grupo de la Universidad de Almería para la identificación del gen.

En primer lugar se genotiparon las plantas F2 analizando marcadores moleculares seleccionados a partir de un mapa genético de tomate (Capel *et al.*, 2015), los cuales estaban distribuidos a lo largo de los 12 cromosomas. Mediante esta estrategia de mapeo fino, se localizó el locus *RES* en el brazo largo del cromosoma 12, dentro de un intervalo de 631 kb entre los genes *MADS-box* (Solyc12g056460) y *ETR2b* (Solyc12g056990) (Figura 41A, B). En esta región genómica se han anotado 52 potenciales genes, o modelos génicos, la mayoría de ellos con funciones biológicas predichas que podrían estar directa- o indirectamente relacionadas con el fenotipo *res*, y por tanto debían considerarse genes candidatos para ser *RES*. Paralelamente, mediante secuenciación masiva se obtuvo la secuencia del genoma haploide de *res* (30x cobertura) a partir de una muestra de DNA generada agrupando cantidades equivalentes de DNA de 24 plantas F2 con fenotipo mutante. A continuación, se rastrearon inserciones/delecciones y polimorfismos de un solo nucleótido (*single nucleotide polymorphism*, SNP) comparando la secuencia del *pool* de DNA mutante con el genoma de referencia de tomate mediante GenomeMapper (Schneeberger *et al.*, 2009). Dentro del intervalo de mapeo de 631 kb previamente delimitado, se identificó una diferencia de un solo nucleótido entre el DNA de plantas de fenotipo *res* y la secuencia de referencia de tomate. La existencia de dicha mutación se confirmó mediante secuenciación convencional Sanger y se mapeó un marcador genético específico para la

mutación en la población F2. Así, se determinó que la mutación se encontraba en el primer exón del gen Solyc12g056740 y que co-segregaba con el fenotipo del mutante *res* (Figura 41C).

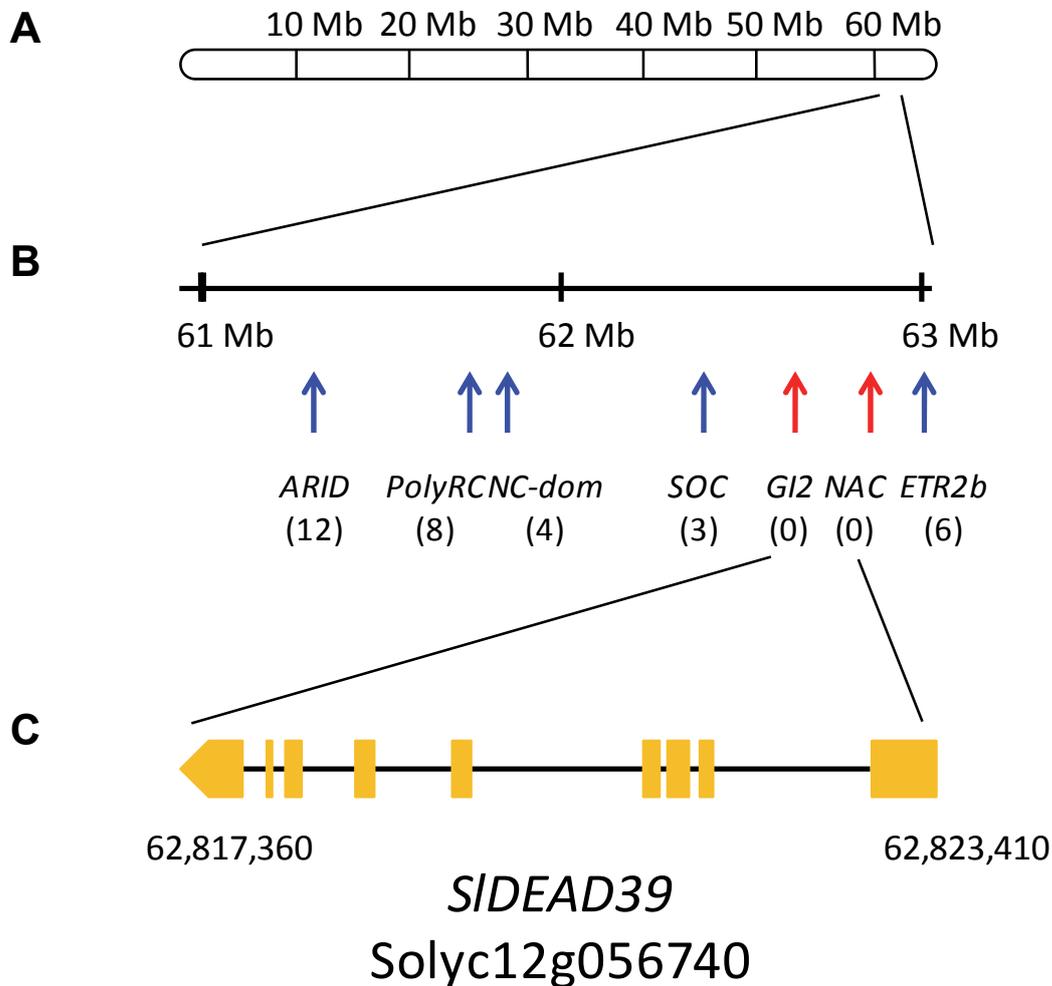


Figura 41. Identificación del gen *RES*. **(A)** Mapeo genético de la mutación en el cromosoma 12, a partir de una población F2 segregante obtenida del cruce entre una planta *res* sin inserto T-DNA y una planta de *S. pimpinellifolium* accesión LA1589. **(B)** El mapeo fino delimitó la posición del gen en un intervalo de 631 Kb entre los genes *MADS-box* (Solyc12g056460) y *ETR2b* (Solyc12g056990). Los números entre paréntesis indican el número de recombinaciones cromosómicas identificadas entre *res* y cada marcador genético empleado en el mapeo del gen. **(C)** Organización genómica del gen *RES* (*SIDEAD39*, Solyc12g056740), indicando los exones y los intrones mediante recuadros amarillos y líneas, respectivamente. El último exón termina en punta de flecha, indicando el sentido de la transcripción.

Capítulo II. Resultados



Figura 42. Alineamiento de la secuencia de aminoácidos de RH39 de Arabidopsis (accesión NP_849348.1 de Genbank) y DEAD39 de tomate (XP_004252562.1) mediante Clustal. Los nueve dominios característicos de las proteínas DEAD-box están representados por recuadros de distintos colores, indicando los nombres de cada dominio (Q, I, Ia, Ib, II, III, IV, V, VI). El recuadro amarillo dentro del dominio I indica la posición de la mutación *res* (cambio de aminoácido de G a D). El dominio II (recuadro rojo) contiene la secuencia D-E-A-D a la que debe su nombre esta familia de RNA helicasas. La predicción del péptido señal al plasto en RH39 y DEAD39 se indica en el extremo N- terminal de la secuencia en recuadros de color verde. Los asteriscos (*) representan la coincidencia de un aminoácido. Los dos puntos (:) indican la sustitución por un aminoácido de propiedades similares. Los puntos simples (.) indican la sustitución por un aminoácido de propiedades distintas.

En la base de datos Sol Genomics Network, Solyc12g056740 está anotado como el gen codificante de *SIDEAD39*, una de las 42 proteínas DEAD-box RNA helicasas (DBRHs) existentes en tomate. Dicha proteína tiene una longitud de 636 aminoácidos, una masa molecular predicha de 70 kDa, un punto isoeléctrico de 9,88 y su función es desconocida (Xu *et al.*, 2013a). El nombre DEAD otorgado a esta familia de proteínas se debe a la secuencia de aminoácidos Asp-Glu-Ala-Asp (D-E-A-D) presente en el dominio II, uno de los nueve dominios conservados en la secuencia primaria de las RNA helicasas. La mutación SNP en *res* provoca la sustitución de un aminoácido conservado de Gly localizado en el dominio I por Asp. La proteína de Arabidopsis que presenta mayor grado de homología con *SIDEAD39* es RH39, compartiendo un 65% de identidad de secuencia (Figura 42). Los nueve dominios característicos de las proteínas DEAD-box están altamente conservados entre *SIDEAD39* y RH39. Además, ambas proteínas contienen en su secuencia un putativo péptido señal al plasto (Figura 42), lo que sugiere que la proteína *SIDEAD39* podría localizarse en el cloroplasto, al igual que se demostró para RH39.

3.2.2. Análisis fenotípico de las líneas de sobreexpresión y silenciamiento de *SIDEAD39*

Una vez identificado el gen mutado en *res*, el grupo de investigación del IBMCP llevó a cabo la generación de líneas de sobreexpresión de *SIDEAD39* en plantas WT (líneas de sobreexpresión, 'O'), sobreexpresión de *SIDEAD39* en plantas *res* (líneas de complementación, 'C'), e inhibición de *SIDEAD39* en plantas WT mediante la estrategia de RNA interferente (líneas de silenciamiento, RNAi). Estas líneas fueron transferidas al CEBAS para llevar a cabo su caracterización fenotípica.

Líneas de complementación

La sobreexpresión de *SIDEAD39* en *res* complementa la mutación, ya que las ocho líneas de complementación independientes presentaron fenotipo WT (Figura 43A). Seguidamente, se seleccionaron dos líneas de complementación para realizar una caracterización más detallada, C-2 y C-14, con valores de expresión relativa de *SIDEAD39* 13,2 y 5,3 veces superior a WT (cv. Moneymaker), respectivamente. La complementación del fenotipo mutante fue corroborada mediante el análisis

microscópico de secciones transversales de hoja, en las que se observó la ausencia de alteraciones en la estructura celular que sí están presentes en las hojas de *res* cuando las plantas se desarrollan en ausencia de estrés (Figura 43B). Además, las líneas de complementación tampoco mostraron la característica clorosis foliar del mutante, como demostraron los datos de contenido en clorofila y eficiencia fotosintética (Figura 43C).

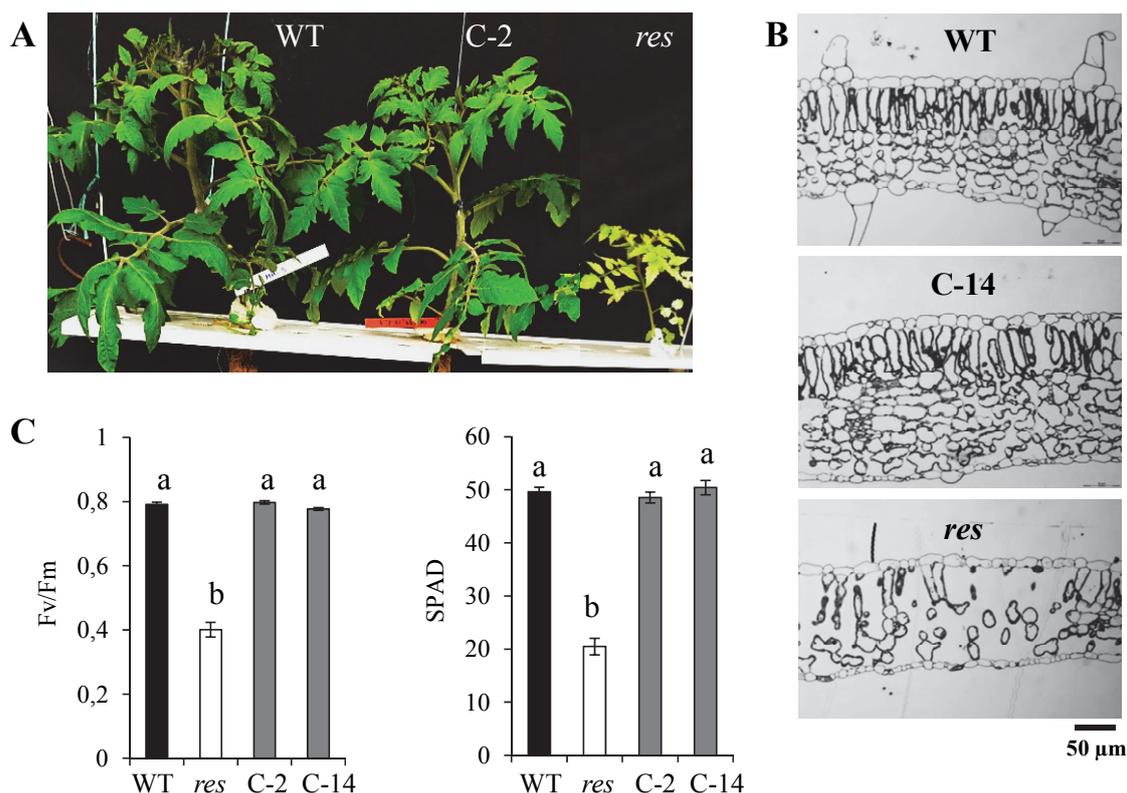


Figura 43. Complementación del fenotipo *res*. (A) Las líneas de complementación (sobrexpresión de *SIDEAD39* en plantas de genotipo *res*) recuperan el fenotipo WT. (B) Imágenes de microscopía óptica de secciones transversales de WT, *res* y una línea de complementación, C-14, observándose la recuperación de la estructura celular. (C) Eficiencia fotosintética (Fv/Fm) y contenido de clorofila (SPAD) en plantas WT, *res* y dos líneas de complementación independientes, C-2 y C-14. Los datos corresponden a la media \pm error estándar de tres réplicas biológicas. Las diferentes letras indican diferencias significativas entre medias, determinadas mediante test LSD ($P < 0,05$).

La caracterización fenotípica de las líneas de complementación también se llevó a cabo en condiciones de estrés salino. Se compararon diferentes rasgos fenotípicos como número de hojas, diámetro del tallo, número de brotes secundarios y racimos entre plantas WT, *res*, y líneas de complementación C-2 y C-14 después de un tratamiento salino de 10 días (200 mM NaCl). Así, se comprobó que los valores de los caracteres de

desarrollo analizados eran similares entre las líneas de complementación y WT, independientemente del tratamiento (control y salino), y significativamente superiores a los de las plantas mutantes (Figura 44). Además, los valores de eficiencia fotosintética y contenido en clorofila eran también similares en las plantas WT, C-2 y C-14, mientras que los de *res* eran significativamente menores en control pero aumentaron con el estrés salino, como ya se había caracterizado previamente (Figura 44).

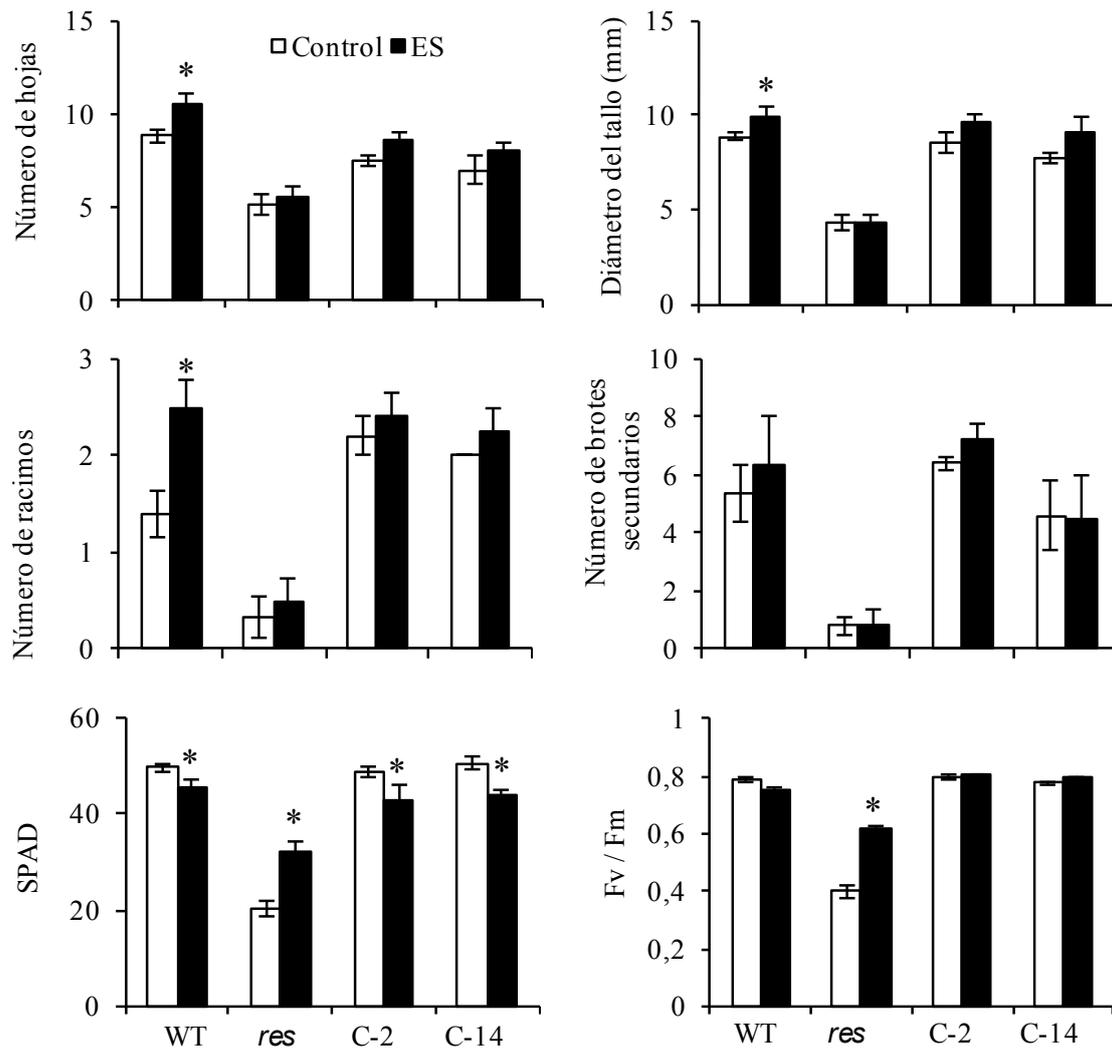


Figura 44. Caracterización fenotípica de las líneas de complementación C-2 y C-14 en ausencia de estrés (control) y estrés salino (ES, 200 mM NaCl durante 10 días). Se determinó el número de hojas, diámetro del tallo, número de racimos y brotes secundarios, contenido de clorofila (SPAD) y eficiencia fotosintética (Fv/Fm). Los resultados se expresan como media \pm error estándar de tres réplicas biológicas. Los asteriscos indican diferencias significativas entre tratamientos determinadas mediante un test *t* de Student ($P < 0.05$).

Líneas de sobreexpresión

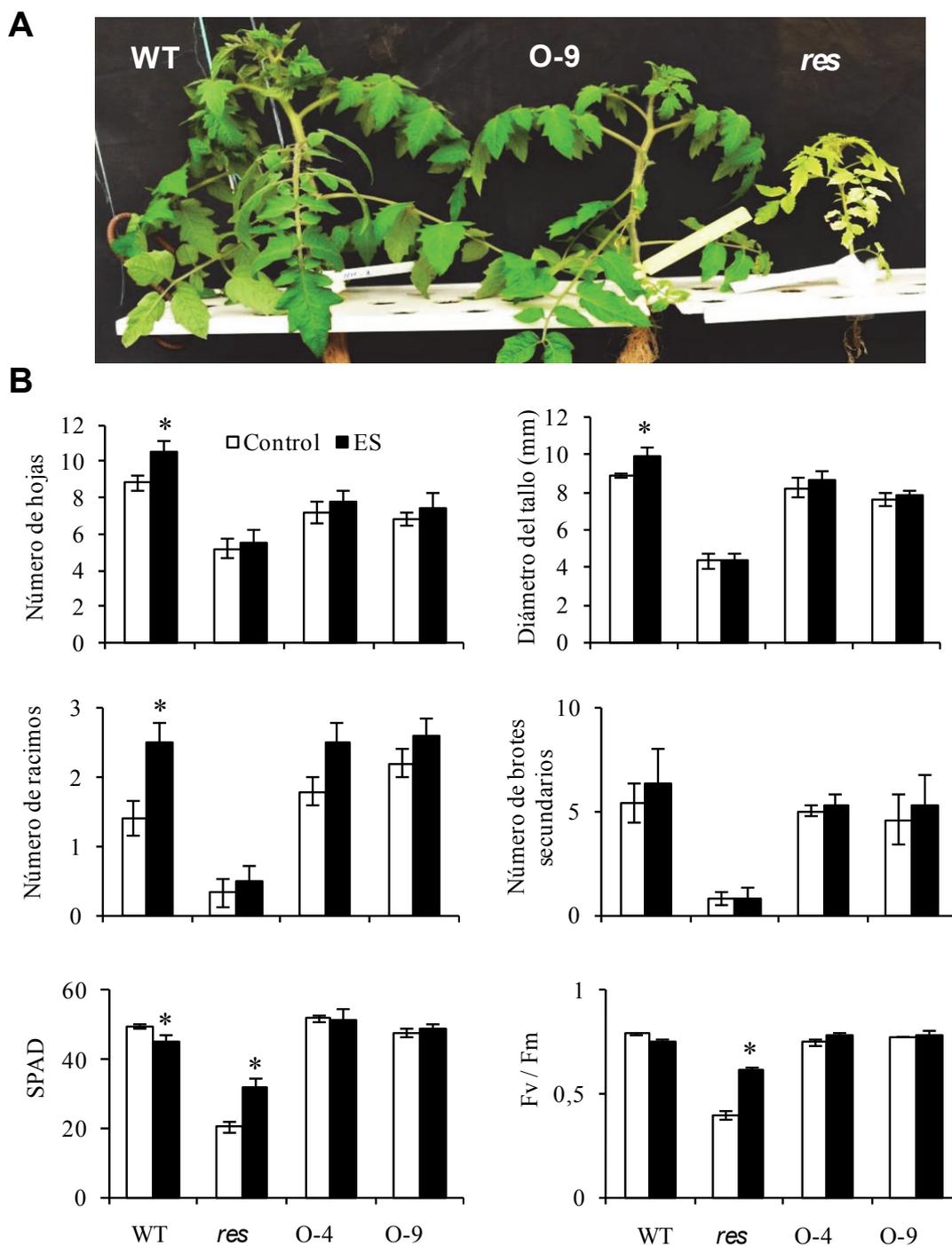


Figura 45. Caracterización fenotípica de las líneas de sobreexpresión O-4 y O-9 en ausencia de estrés (control) y estrés salino (ES, 200 mM NaCl durante 10 días). (A) Las líneas de sobreexpresión muestran en ausencia de estrés un fenotipo similar al de las plantas WT. (B) Se determinó el número de hojas, diámetro del tallo, número de racimos y brotes secundarios, contenido de clorofila (SPAD) y eficiencia fotosintética (Fv/Fm). Los resultados se expresan como media \pm error estándar de tres réplicas biológicas. Los asteriscos indican diferencias significativas entre tratamientos determinadas mediante un test *t* de Student ($P < 0,05$).

Las siete líneas independientes de sobreexpresión de *SIDEAD39* en fondo genético MoneyMaker (WT) también mostraron fenotipo WT, y dos de ellas, O-4 y O-9, con valores de expresión relativa de *SIDEAD39* 8,6 y 9,0 veces superior a WT, respectivamente, fueron seleccionadas para avanzar en su caracterización fenotípica en control y estrés salino (Figura 45A, B).

Líneas RNAi

Adicionalmente, para corroborar que el fenotipo *res* estaba provocado por la pérdida de función de *SIDEAD39*, se generaron siete líneas transgénicas diploides independientes a partir del cultivar MoneyMaker (WT) en las cuales se silenció el gen *SIDEAD39* mediante una estrategia de RNA de interferencia (RNAi). Los análisis fenotípicos revelaron que las líneas de silenciamiento presentaban inhibición del desarrollo, clorosis foliar y alteraciones en la estructura celular (Figura 46A-C). No obstante, se observaron diferencias fenotípicas entre las líneas RNAi en ausencia de estrés, que parecen estar relacionadas con el grado de silenciamiento de *SIDEAD39*. Así, las plantas de la línea RNAi-9, con una expresión de 0,1 respecto a WT, mostraron el fenotipo más similar a *res* en cuanto a clorosis foliar e inhibición del desarrollo. Otras líneas, RNAi-7.1 y RNAi-2, con niveles de expresión de 0,07 y 0,01 respecto a WT, respectivamente, presentaron una reducción del desarrollo más severa y senescencia en las hojas, especialmente en el borde de los folíolos, donde el contenido de clorofila era menor (Figura 46B). Los síntomas de senescencia fueron especialmente severos en la línea RNAi-2, que finalmente no sobrevivió más de unas pocas semanas tras la aclimatación *in vivo*. La severidad del fenotipo en las líneas a mayor nivel de silenciamiento sugiere que el gen *SIDEAD39* es esencial para el desarrollo en tomate.

Anteriormente se ha demostrado que las alteraciones fenotípicas del mutante *res* desaparecen cuando es sometido a estrés salino. Con el objetivo de averiguar si este fenómeno ocurre también en las líneas de silenciamiento se seleccionó la línea RNAi-9, que presenta un fenotipo similar a *res*, para evaluar su fenotipo en condiciones de salinidad (Figura 47). Efectivamente, tras 5 días de tratamiento salino (200 mM NaCl), ya observamos un incremento significativo del contenido de clorofila y la eficiencia fotosintética tanto en el mutante como en la línea RNAi-9, así como una recuperación parcial de la estructura celular de la hoja (Figura 47).

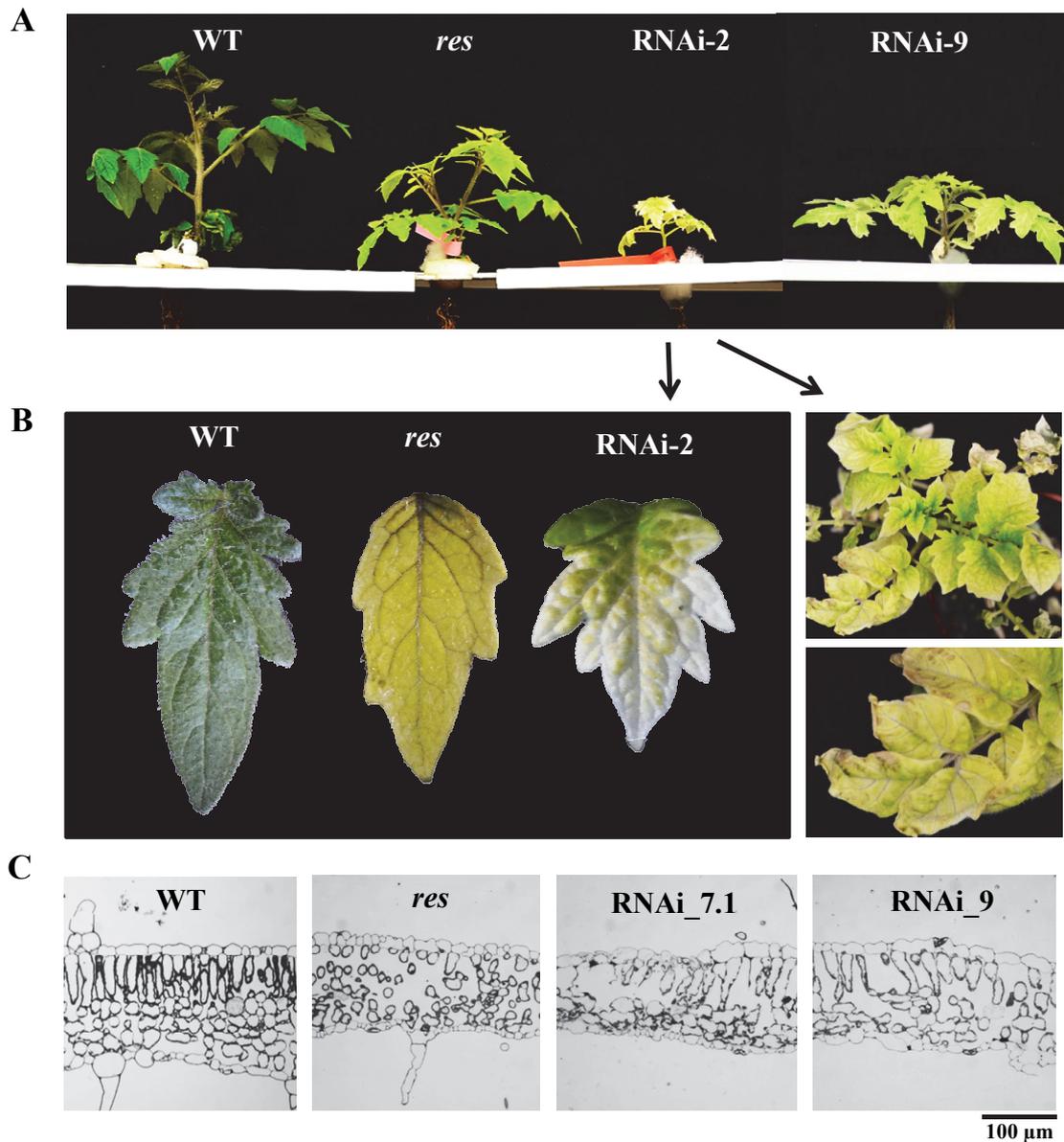


Figura 46. Caracterización fenotípica de las líneas transgénicas de silenciamiento de *SIDEAD39*. **(A)** Las líneas RNAi muestran inhibición del desarrollo y clorosis foliar, aunque existen diferencias fenotípicas entre ellas que parecen relacionadas con su nivel de silenciamiento génico. Las plantas de RNAi-9 (expresión de *SIDEAD39* de 0,1 respecto a WT) presentan un fenotipo similar a *res*, mientras que las de RNAi-2 (expresión de 0,01 respecto a WT), presentan síntomas más severos. **(B)** En la izquierda, imágenes de lupa de folíolos jóvenes de plantas WT, *res* y RNAi-2. En la derecha, síntomas de senescencia y necrosis en folíolos de plantas RNAi-2, que finalmente mueren tras varias semanas de aclimatación *in vivo*. **(C)** Imágenes de secciones transversales de hojas de plantas WT, *res*, RNAi-7.1 y RNAi-9 obtenidas por microscopía óptica, en las que se observan alteraciones en la estructura celular.

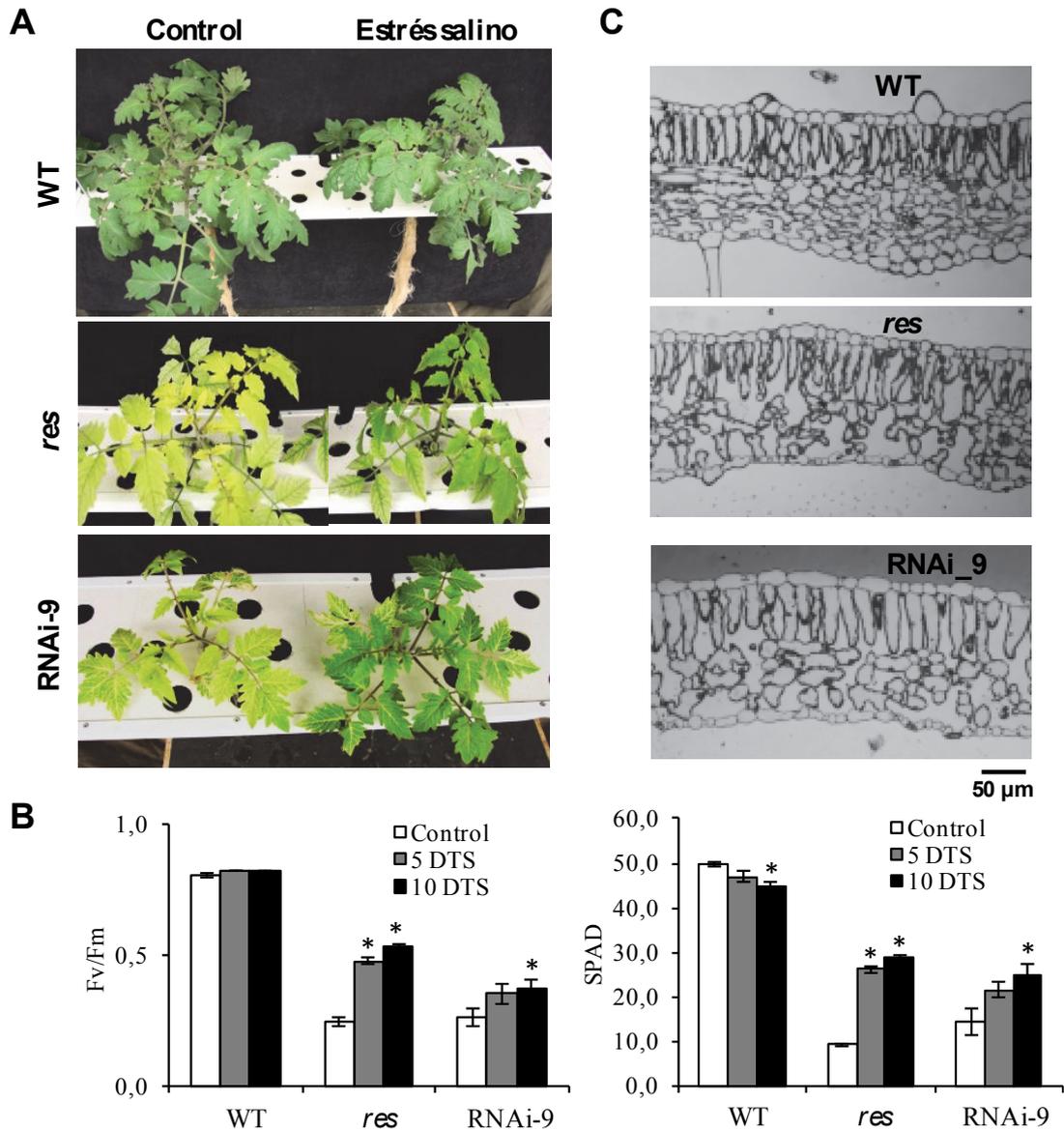


Figura 47. Caracterización fenotípica en estrés salino (200 mM NaCl durante 10 días) de plantas WT, *res* y RNAi-9. **(A)** El estrés salino induce la recuperación del fenotipo WT en plantas *res* y RNAi-9. **(B)** Evolución de la eficiencia fotosintética (Fv/Fm) y el contenido de clorofila (SPAD) en ausencia de estrés (control), tras 5 días de tratamiento salino (5 DTS, cuando se observa la normalización fenotípica) y al final del tratamiento salino (10 DTS). **(C)** Imágenes de secciones transversales de hojas de plantas WT, *res*, y RNAi-9 tras 5 días de estrés salino obtenidas por microscopía óptica, en las que se observa la desaparición de las alteraciones en la estructura celular. Los datos se expresan en valor medio \pm error estándar de tres réplicas biológicas. Los asteriscos en 'B' indican diferencias significativas entre control y estrés salino determinadas por test *t* de Student ($P < 0,05$).

Es interesante señalar que, al igual que se había descrito para *res* (García-Abellán *et al.*, 2015), la inhibición del desarrollo en las líneas RNAi se mantuvo a lo largo de su ciclo vital y también la clorosis foliar, si bien ésta fue mayor en las hojas jóvenes (hojas en desarrollo y primeras hojas completamente desarrolladas) y se redujo en las adultas (a

partir de la 4ª hoja desarrollada). Además, no se observaron alteraciones estructurales en los órganos reproductivos, excepto un retraso en la floración y en el desarrollo de frutos, así como un menor tamaño de los mismos, tal como se observa en plantas adultas de la línea homocigota RNAi-9 respecto la línea acigota procedente de la misma transformación (Figura 48). Por lo tanto, al igual que *res*, las líneas RNAi producen semillas viables.

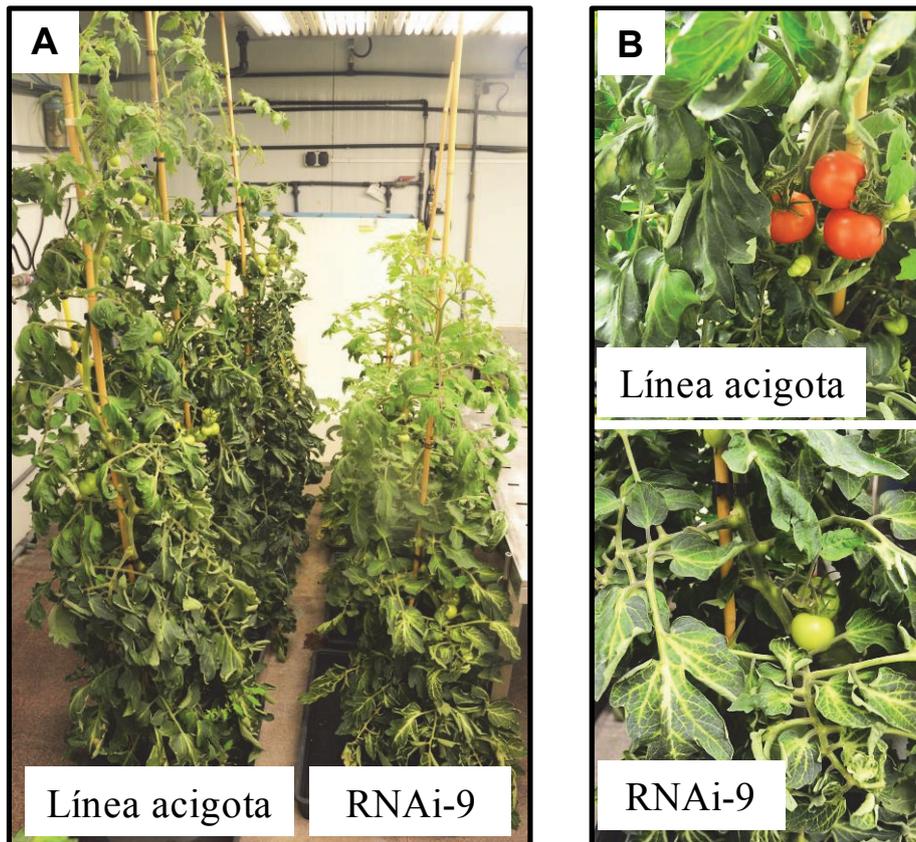


Figura 48. Fenotipo de plantas adultas de la línea de silenciamiento RNAi-9. **(A)** A la derecha, línea homocigota RNAi-9 y a la izquierda línea acigota obtenida en el mismo proceso de transformación pero sin la construcción genética de silenciamiento, la cual se desarrolla de manera similar a las plantas WT. En la línea RNAi-9, la reducción del crecimiento y la clorosis foliar se mantuvo a lo largo del ciclo vital de la planta, aunque la clorosis se redujo conforme aumentaba la edad de los tejidos, de forma similar a la observada en las plantas de *res*. **(B)** Retraso en el desarrollo de los frutos observados en las plantas de la línea homocigota RNAi-9 respecto a la línea acigota.

3.2.3. Análisis del procesamiento del RNA ribosomal 23S en plantas WT y *res* mediante Northern Blot

La proteína DEAD-box RNA helicasa RH39 de *Arabidopsis thaliana* está implicada en la maduración del RNA ribosomal 23S del cloroplasto (rRNA 23S), la cual tiene lugar mediante una serie de fragmentaciones de una secuencia precursora de 2,9 kb en fragmentos maduros de menor longitud (Nishimura *et al.*, 2010). Con el objetivo de averiguar si SIDEAD39 cumple una función similar a la de su homólogo en *Arabidopsis*, se llevó a cabo un análisis del contenido en fragmentos del rRNA 23S en diferentes tejidos de plantas WT y *res* mediante Northern Blot utilizando sondas que cubren la secuencia del rRNA 23S. Así, la sonda 23S FL permite detectar la secuencia completa del rRNA 23S (2,9 kb), mientras que otras dos sondas, 23S P1 y 23S P2, detectan el extremo 5' y una región interna de la secuencia, respectivamente, permitiendo determinar la ocurrencia o no de un corte específico (Figura 49A). Además, teniendo en cuenta la recuperación del fenotipo WT que se observa en el mutante en estrés salino, analizamos el procesamiento del rRNA 23S tanto en ausencia de estrés como en salinidad (5 días 200 mM NaCl).

En primer lugar, es interesante destacar que el patrón de fragmentación del rRNA 23S fue diferente en WT y *res* (Figura 49B-D). En ausencia de estrés, observamos una gran abundancia de fragmentos inmaduros (2,9 kb y 2,4 kb) en *res* respecto a WT, mientras que la presencia de fragmentos maduros (1,3 kb y 1,1 kb) fue prácticamente indetectable en el mutante, tal como se observa en el panel de hibridación con la sonda 23S FL (Figura 49B). La carencia de fragmentos maduros en el patrón del mutante fue especialmente evidente en la 1ª hoja desarrollada y el tallo, mientras que en la 3ª hoja desarrollada se detectaron algunos fragmentos (aunque en cantidades significativamente menores respecto a WT) de los fragmentos de 1,3 y 1,1 kb. Además, mediante la sonda 23S P1 se detectó la secuencia completa de 2,9 kb y el fragmento maduro de 0,5 kb en el mutante, pero no el fragmento intermediario de 1,8 kb (Figura 49C), y mediante la sonda 23S P2 se detectaron las secuencias de 2,9 kb y 2,4 kb, pero tampoco el fragmento de 1,8 kb ni los fragmentos maduros de 1,3 y 1,1 kb (Figura 49D). Estos resultados indican que el mutante *res* es defectivo en el corte que genera los fragmentos maduros de 1,3 y 1,1 kb del rRNA 23S cloroplastidial, y por tanto, SIDEAD39 parece cumplir la misma función en tomate que RH39 en *Arabidopsis*. Finalmente, es interesante destacar que el procesamiento normal del rRNA se recuperó parcialmente en

res en estrés salino, coincidiendo con el inicio de su recuperación fenotípica, pudiendo detectarse una mayor acumulación de fragmentos maduros respecto a control (Figura 49B-D).

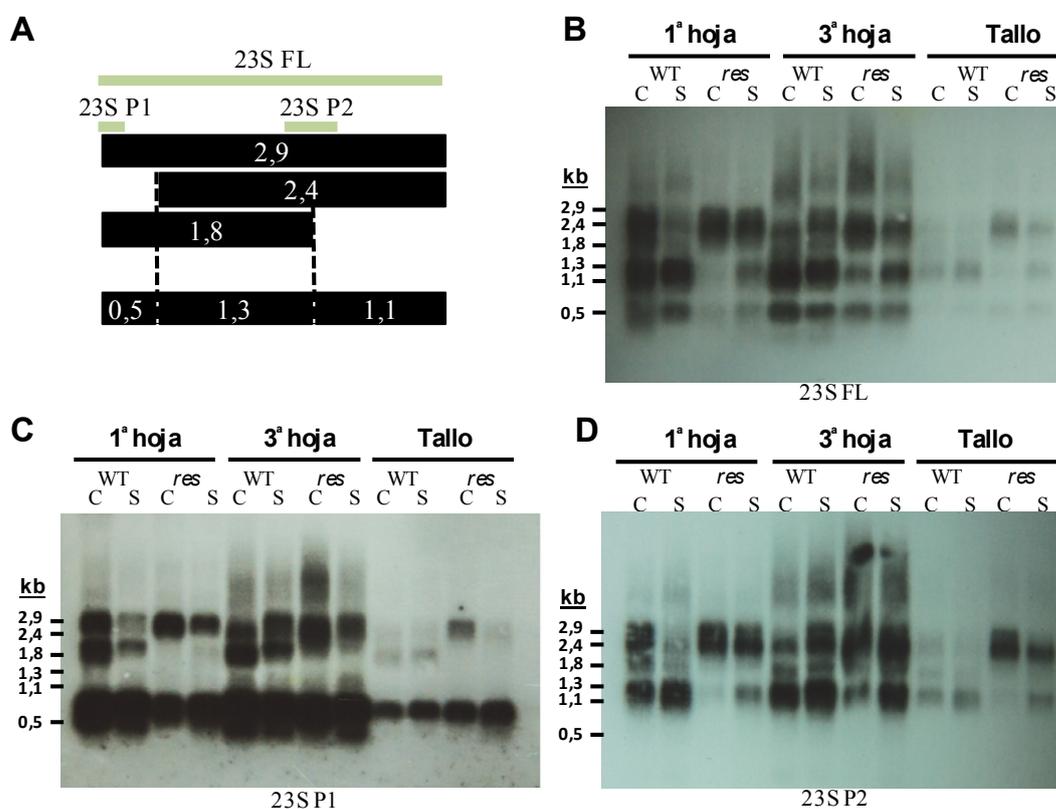


Figura 49. Análisis del procesamiento del RNA ribosomal 23S del cloroplasto (rRNA 23S) en plantas WT y *res* mediante Northern Blot. **(A)** Diagrama detallado del patrón de fragmentación normal del rRNA 23S (barras negras) y posición de las sondas diseñadas en la secuencia, indicadas con líneas verdes (23S FL, 23S P1 y 23S P2). Los números dentro de las barras negras indican la longitud de cada fragmento del 23S en kb. **(B-D)** Patrón de fragmentación del rRNA 23S obtenido para cada sonda en diferentes tejidos de plantas WT y *res* en ausencia de estrés salino (C) y tras un tratamiento salino de 200 mM NaCl durante 5 días (S). El tamaño de cada fragmento detectado (en kb) se indica a la izquierda.

3.2.4. Análisis de expresión de *SIDEAD39* y otros genes de DEAD-box RNA-helicases cloroplastidiales en plantas WT y *res*

El patrón de expresión de *SIDEAD39* fue analizado en distintos tejidos de plantas *res* y WT en ausencia de estrés (Tabla 25), concretamente en raíz, 3ª hoja desarrollada, tallo a la altura de la inserción de la 3ª hoja, 1ª hoja desarrollada, tallo a la altura de la inserción de la 1ª hoja, flores y frutos. Así, la expresión de *SIDEAD39* se detectó en todos los tejidos analizados en plantas WT, siendo menor en la raíz que en la parte aérea

y órganos reproductivos. Además, observamos niveles similares de expresión, e incluso ligeramente superiores, en el mutante respecto a WT, lo que indica que la mutación no impide la transcripción del gen.

Tabla 25. Análisis mediante RT-qPCR del patrón de expresión del gen *SIDEAD39* en distintos tejidos vegetativos y reproductivos de plantas de WT y *res* cultivadas en ausencia de estrés salino. Los resultados muestran los valores de expresión relativos al de la primera hoja desarrollada de WT, a la que se le asignó valor 1. El gen *SIEF-1a* se empleó como gen normalizador. Los resultados representan la media \pm error estándar de tres réplicas biológicas. Los valores con letras diferentes son significativamente diferentes (LSD, $P < 0,05$).

Tejido	Expresión relativa ($2^{-\Delta\Delta Ct}$)	
	WT	<i>res</i>
Raíz	0,41 \pm 0,02	0,49 \pm 0,18
3ª hoja	1,28 \pm 0,25	1,79 \pm 0,50
Tallo (3ª hoja)	1,09 \pm 0,25	1,07 \pm 0,20
1ª hoja	1,00 \pm 0,00	1,57 \pm 0,33
Tallo (1ª hoja)	0,96 \pm 0,40	1,38 \pm 0,52
Flor	0,92 \pm 0,15	1,01 \pm 0,26
Fruto	1,03 \pm 0,18	1,03 \pm 0,10

Una posible explicación para la recuperación del fenotipo mutante en estrés salino es la inducción de otra u otras DBRHs del cloroplasto que complementen la función deficiente de *SIDEAD39*. Para estudiar la plausibilidad de esta hipótesis, en primer lugar se analizó la evolución de la expresión de los nueve genes que codifican DBRHs cloroplastidiales (*SIDEAD5*, *SIDEAD11*, *SIDEAD17*, *SIDEAD23*, *SIDEAD25*, *SIDEAD28*, *SIDEAD33*, *SIDEAD35* y *SIDEAD39*) en la 1ª hoja desarrollada de plantas WT y *res* durante 5 DTS (Tabla 26). Curiosamente, las mayores diferencias entre WT y *res* se detectaron en control, donde se observó una mayor expresión de la mayoría de las DBRHs en *res*, especialmente *SIDEAD5* y *SIDEAD35*. Sin embargo, en estrés salino no se observó una inducción significativa de ninguna de las DBRHs en el mutante, y los niveles de expresión fueron similares tras 1 DTS y 5 DTS.

Tabla 26. Análisis de expresión por RT-qPCR de los genes que codifican DEAD-box RNA helicasas probablemente localizadas en el cloroplasto. Los análisis de expresión se llevaron a cabo en la 1ª hoja desarrollada de plantas WT y *res*, en ausencia de estrés (Control), y tras 1 y 5 días de tratamiento salino con 200 mM NaCl (1DTS, 5DTS). El nivel de expresión se relativizó al valor de la hoja de WT en ausencia de estrés salino. Los resultados se expresan como valor medio \pm error estándar de tres réplicas biológicas. El gen *SIEF-1a* se empleó como gen normalizador. Los resultados representan la media \pm error estándar de tres réplicas biológicas.

Gen	Tratamiento	Expresión relativa ($2^{-\Delta\Delta Ct}$)	
		WT	<i>res</i>
DEAD5	Control	1,00 \pm 0,14	6,28 \pm 0,14
	1DTS	1,74 \pm 0,21	2,25 \pm 0,96
	5DTS	1,76 \pm 0,25	2,78 \pm 1,26
DEAD11	Control	1,00 \pm 0,02	1,46 \pm 0,19
	1DTS	0,91 \pm 0,22	1,57 \pm 0,19
	5DTS	2,24 \pm 0,63	0,89 \pm 0,27
DEAD17	Control	1,00 \pm 0,32	3,10 \pm 1,02
	1DTS	0,47 \pm 0,02	0,59 \pm 0,32
	5DTS	0,32 \pm 0,07	1,14 \pm 0,68
DEAD23	Control	1,00 \pm 0,19	2,09 \pm 0,47
	1DTS	1,19 \pm 0,23	1,53 \pm 0,83
	5DTS	2,05 \pm 0,91	2,30 \pm 0,25
DEAD25	Control	1,00 \pm 0,26	1,18 \pm 0,23
	1DTS	0,67 \pm 0,10	1,25 \pm 0,48
	5DTS	0,73 \pm 0,26	0,71 \pm 0,30
DEAD28	Control	1,00 \pm 0,27	2,11 \pm 0,28
	1DTS	1,03 \pm 0,23	1,87 \pm 0,32
	5DTS	1,16 \pm 0,12	1,38 \pm 0,20
DEAD33	Control	1,00 \pm 0,20	1,47 \pm 0,17
	1DTS	1,06 \pm 0,19	1,15 \pm 0,61
	5DTS	1,33 \pm 0,20	1,30 \pm 0,61
DEAD35	Control	1,00 \pm 0,00	5,26 \pm 0,82
	1DTS	0,93 \pm 0,22	2,46 \pm 1,06
	5DTS	1,12 \pm 0,16	4,53 \pm 1,28
DEAD39	Control	1,00 \pm 0,37	1,54 \pm 0,22
	1DTS	0,92 \pm 0,37	2,77 \pm 0,69
	5DTS	4,36 \pm 1,52	3,30 \pm 0,89

Teniendo en cuenta estos resultados, a continuación se analizó la expresión en control y 1 DTS de las nueve DBRHs en la 3ª hoja, con un mayor desarrollo que la anterior y en la que también se observó reversión fenotípica en salinidad. Además de WT y *res*, se incluyó la línea RNAi-9 en el análisis, ya que la supuesta complementación de SIDEAD39 en salinidad debería ocurrir tanto en el mutante *res* como en las líneas de silenciamiento. En este análisis, se detectó nuevamente una mayor expresión de los genes DBRHs en ausencia de estrés en el mutante respecto a WT, especialmente *SIDEAD35*, *SIDEAD33*, *SIDEAD17*, *SIDEAD23* y *SIDEAD5*, tendencia que también se

observó en la línea RNAi-9 (Figura 50). No obstante, los niveles de expresión de las DBRHs fueron en general más elevados que los observados en la 1ª hoja. Además, la sobreexpresión de las DBRHs en *res* y RNAi-9 respecto a WT se mantuvo en salinidad, y algunas incrementaron aún más su expresión respecto a control. Concretamente, en la hoja de *res* se observó la inducción en salinidad de *SIDEAD35*, *SIDEAD17* y *SIDEAD5*, y *SIDEAD33* se indujo tanto en *res* como en la línea RNAi-9, y también en WT.

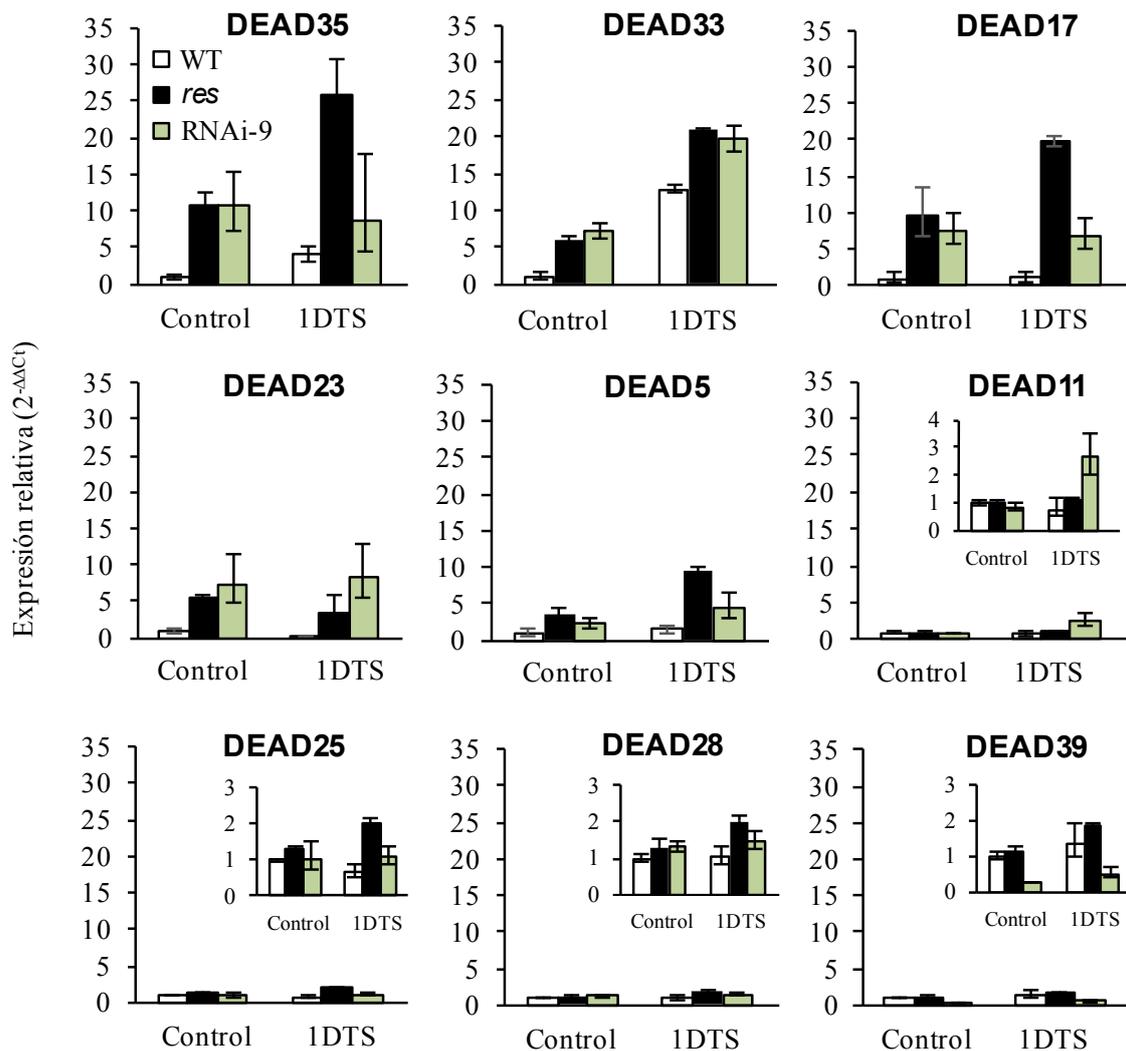


Figura 50. Análisis de expresión por RT-qPCR de los genes que codifican DEAD-box RNA helicasas cloroplastidiales en la 3ª hoja desarrollada de plantas WT, *res* y RNAi-9, en ausencia de estrés (control), y tras 1 día de exposición a 200 mM NaCl (1 DTS). El nivel de expresión se relativizó al valor de la hoja de WT en ausencia de estrés salino. Los resultados se expresan como valor medio ± error estándar de tres réplicas biológicas. El gen *SIEF-1a* se empleó como gen normalizador. Los resultados representan la media ± error estándar de tres réplicas biológicas.

4. DISCUSIÓN

4.1. Análisis transcriptómico del mutante *res*

4.1.1. La normalización del fenotipo *res* en salinidad está relacionada con una considerable reducción de la alteración constitutiva de genes en raíz

El análisis transcriptómico comparativo reveló importantes diferencias de expresión constitutivas entre las raíces de *res* y WT. Así, en ausencia de estrés, detectamos 3046 GDEs en raíces, respecto a los 1019 GDEs encontrados en hojas de *res* vs WT (Figura 36A). Mientras que los genes que promueven el desarrollo vegetal estaban inhibidos en las raíces de *res* (Tabla 23), se detectó una activación constitutiva de genes implicados en la biosíntesis (*AOS*, *LOX3*) y señalización (*JAZ*) de JA (Tabla 18), lo que concuerda con la mayor acumulación de JA observada en la raíz de mutante en ausencia de estrés (García-Abellán *et al.*, 2015). Algunos estudios apuntan que la señalización de JA y ET a menudo operan de manera sinérgica para activar las respuestas defensivas de la planta (Kazan, 2015). En nuestro análisis, también observamos la inducción constitutiva en la raíz del mutante de genes que codifican factores de respuesta de ET (*ERFs*) (Tabla 18).

Las hormonas vegetales actúan como reguladores centrales de las cascadas de señalización que regulan la adaptación a situaciones de estrés, coordinando la expresión de factores de transcripción y otros genes efectores (Xia *et al.*, 2015). En concordancia con este proceso, las raíces de *res* en control mostraron una activación constitutiva de genes implicados en diferentes procesos, desde señalización mediada por Ca^{2+} (Tabla 19) y factores de transcripción como WRKYs y MYBs (Tabla 20), hasta genes que codifican proteínas de respuesta a estrés (Tabla 21). Generalmente en halófitas y también en algunas especies silvestres de tomate, se han observado altos niveles constitutivos de expresión de genes de respuesta a estrés, lo que resulta determinante para su tolerancia, aunque normalmente exhiben un desarrollo más lento debido al coste energético que supone la activación de las respuestas defensivas (Park *et al.*, 2016; Albaladejo *et al.*, 2017). Es interesante mencionar que algunos de estos genes constitutivamente expresados en el mutante *res* están comúnmente asociados con la respuesta a estrés biótico, lo que apoya nuestras sugerencias previas respecto a la posible tolerancia de *res* a múltiples estreses, tanto abióticos como bióticos (García-Abellán *et al.*, 2017). En condiciones salinas, las diferencias de expresión entre WT y

res se redujeron hasta un 90% respecto a las raíces no tratadas (Figura 36A). Las diferencias de expresión en genes implicados en el metabolismo de JA y ET, señalización celular, factores de transcripción y proteínas de estrés se atenuaron considerablemente o desaparecieron en estrés salino, lo cual se debió fundamentalmente a la inhibición de estos genes en las raíces del mutante en sal respecto a control (Tablas 18-21). Estos resultados sugieren una relación entre la recuperación del fenotipo WT en el mutante con la atenuación de las diferencias de expresión génica en la raíces. En este sentido, algunos estudios señalan que la atenuación de las respuestas defensivas reguladas por JA reduce el efecto inhibitorio sobre el crecimiento (Meldau *et al.*, 2012; Mitra y Baldwin, 2014).

La redirección de recursos energéticos hacia un mayor crecimiento en las raíces del mutante en estrés salino también se apoya en el aumento de la expresión en este tejido de los genes relacionados con procesos de desarrollo (extensinas, expansinas y otros genes de modificación de la pared celular) en estrés salino respecto a control (Tabla 23), resultando prácticamente en la desaparición de las diferencias de expresión entre WT y *res* en estos genes. En resumen, la dinámica transcripcional observada en las raíces de *res* refleja que el balance desarrollo-defensa está inclinado hacia la defensa en ausencia de estrés y hacia el desarrollo en condiciones de estrés salino.

4.1.2. La normalización del fenotipo *res* en salinidad está relacionada con la inducción en hoja de genes que promueven la tolerancia a estrés y la fotosíntesis

El número de GDEs entre las hojas de *res* y WT fue aproximadamente 5 veces mayor que en raíces (1366 y 295 GDEs, respectivamente) en condiciones de estrés salino (Figura 36A), siendo la categoría funcional de proteínas relacionadas con el estrés una de las que más aumentó en estrés salino respecto a control (Figura 37A). Considerando que muchos genes implicados en la respuesta a estrés muestran expresión circadiana (Seo y Mas, 2015), es interesante mencionar que se detectó un grupo de GDEs del ciclo circadiano entre hojas de *res* y WT específicamente en estrés salino (Tabla 20). Müller *et al.* (2016) señalaron que los ritmos circadianos lentos permitían una mejor adaptación del tomate cultivado a los días largos del periodo estival (normalmente caracterizados por condiciones ambientales de estrés), y nuestros datos de transcriptómica sugieren que *res* presenta ritmos circadianos más lentos que WT. Así, se han identificado los dos componentes principales del oscilador central, *CCA1* y *TOC1*, siendo *CCA1* un represor

de *TOC1* (Gendron *et al.*, 2012). También otros genes importantes del ciclo, *ELF4*, *CO*, *FKF-1*, el factor de transcripción *JmJC* y *GIGANTEA (GI)*, los cuales estaban inhibidos en las hojas de *res* comparadas con las de WT en estrés salino (Tabla 20). De hecho, los mutantes *gi* son tolerantes a estrés salino, mostrando un crecimiento continuado en condiciones de estrés (Park *et al.*, 2016). La inhibición de la expresión de *GI* en hojas de *res* respecto a WT en estrés salino se corroboró mediante RT-qPCR (Figura 39). En estrés salino, las plantas de *res* recuperan el fenotipo WT y la estructura celular, incluida la de los cloroplastos (García-Abellán *et al.*, 2015). Este fenómeno explicó la notable recuperación del color verde de las hojas del mutante en salinidad, la cual se reflejó en un incremento del contenido de clorofila (Figura 35C). Otra característica fisiológica de la tolerancia del mutante fue el incremento de la eficiencia fotosintética en estrés salino (Figura 35C), un fenómeno que solo se ha observado en algunos casos en especies halófitas (Redondo-Gómez *et al.*, 2010). El incremento de la eficiencia fotosintética con la salinidad en *res* coincidió con la activación específica en el mutante respecto a WT de genes relacionados con la fotosíntesis y el metabolismo energético, especialmente el gen *RCAI* (Tabla 24). La proteína Rubisco activasa (RCA) lleva a cabo la reparación molecular de la enzima Rubisco, que es extremadamente ineficiente y requiere de dicha activación para llevar a cabo su función (Bracher *et al.*, 2017). La optimización de la Rubisco es un problema importante para la mejora de la productividad vegetal, y por ahora las estrategias enfocadas a aumentar el rendimiento de los cultivos mediante la ingeniería genética de Rubisco no han resultado satisfactorias (Bhat *et al.*, 2017). La sobreexpresión de *RCAI* en las hojas de *res* en salinidad respecto a las de WT fue confirmada por RT-qPCR (Figura 39). Estos mayores niveles de expresión en el mutante podrían favorecer la reparación de la Rubisco, y por tanto su eficiencia en estrés salino.

Otro gen sobreexpresado en las hojas de *res* vs WT en estrés salino fue *AOX1A* (Tabla 24, Figura 39). La función de AOX es oxidar el exceso de equivalentes de reducción originados en el cloroplasto a través de la válvula de malato (Taniguchi y Miyake, 2012; Zhang *et al.*, 2012). De acuerdo con la inducción de esta ruta en el mutante, otro gen componente de la válvula de malato, *GLYCERALDEHYDE-3-PHOSPHATE DEHYDROGENASE (GAPDH)*, también estaba sobreexpresado en las hojas del mutante en condiciones de salinidad (Tabla 24). Diferentes estudios han señalado la importancia de AOX en la optimización de la fotosíntesis en condiciones de estrés

abiótico (Vanlerberghe, 2013; Vishwakarma *et al.*, 2015; Dinakar *et al.*, 2016; Vanlerberghe *et al.*, 2016). Por ejemplo, plantas de *Arabidopsis* que sobreexpresaban *AOX* mostraron mayor crecimiento que las plantas WT en condiciones de sequía (cz *et al.*, 2010), y en estudios de mejora genética se ha señalado a *AOX* como marcador de una reprogramación celular eficiente durante el desarrollo vegetal en condiciones de estrés (Arnholdt-Schmitt *et al.*, 2006). En conjunto, nuestros resultados sugieren que el mayor crecimiento y tolerancia a estrés salino del mutante *res* respecto a WT están relacionados con una mayor expresión en salinidad de genes clave implicados en la optimización de la fotosíntesis, especialmente *RCAI* y *AOX1A*.

4.1.3. Los factores de transcripción *WRKY39* y *MYB14* y el inhibidor de proteasas *MPI* pueden ser claves en la tolerancia del mutante *res*

La importancia de los genes *WRKY* y *MYB* en la tolerancia a estreses abióticos es bien conocida (Li *et al.*, 2015a; Phukan *et al.*, 2016), aunque su función en la tolerancia a salinidad en tomate aún no se ha estudiado en profundidad (Huang *et al.*, 2012; Li *et al.*, 2016b). Recientemente, en nuestro grupo se identificó el gen *ARSI*, el primer MYB de tipo R1 identificado en tomate, cuya función es regular la apertura estomática durante el estrés salino y así limitar la cantidad de Na^+ que es transportado a las hojas (Campos *et al.*, 2016). Cabe mencionar que en el microarray, el gen *ARSI* estaba sobreexpresado en las hojas de *res* respecto a las de WT específicamente en estrés salino (Tabla 20). Dos genes, *WRKY39* y *MYB14*, parecen estar implicados en el fenotipo de *res* y su normalización en condiciones de estrés salino, de acuerdo a su perfil de expresión en raíces y hojas del mutante respecto a WT (Figura 39). Además, ambos genes muestran perfiles de expresión opuestos en raíces y hojas de *res*, lo que sugiere que su regulación es específica para cada tejido. Finalmente, cabe mencionar que *MYB14* es uno de los pocos genes cuya expresión aumentó en las raíces de *res* en estrés salino respecto a control (Figura 39).

El mantenimiento de la homeostasis proteica, es decir el balance entre la biosíntesis de proteínas y su degradación, es crucial para la supervivencia de la planta (Kidric *et al.*, 2014). Es interesante señalar que hemos detectado en ambos tejidos y condiciones experimentales importantes diferencias de expresión entre *res* y WT de genes relacionados con el metabolismo de proteínas, especialmente aquellos que codifican proteasas e inhibidores de proteasas (PIs) (Tabla 22). Los PIs se han asociado

generalmente a la respuesta a estreses de tipo biótico (Martel *et al.*, 2015), aunque también están implicados en la respuesta a estreses abióticos (Sun *et al.*, 2013). Así, la sobreexpresión de un gen inhibidor de cisteína-proteasa de *Jatropha curcas* en *Nicotiana benthamiana* le confirió mayor tolerancia a la salinidad (Li *et al.*, 2015b). Un gen que cabe destacar es *MPI* (Solyc07g007250.2.1), que mostró el mayor nivel de sobreexpresión en hojas de *res* respecto a WT, especialmente en control pero también en estrés salino. Además, la expresión de *MPI* aumentó en la raíz de *res* en estrés salino respecto a control (Figura 39). Estos resultados sugieren que *MPI*, y probablemente otros genes de *PIs*, juegan un papel importante en la tolerancia de *res* a la salinidad.

En resumen, mediante el análisis microarray hemos descubierto las alteraciones transcriptómicas subyacentes al fenotipo del mutante *res* y su recuperación en estrés salino, además de identificar posibles genes con un papel importante en la tolerancia a salinidad en tomate.

4.2. Identificación y análisis funcional del gen *RES*

4.2.1. El gen *RES* codifica para *SIDEAD39*, una proteína DEAD-box RNA helicasa

Mediante el mapeo fino y secuenciación del locus *RES*, se determinó que la mutación responsable del fenotipo mutante era un SNP en el gen *SIDEAD39*, que codifica para una DEAD-box RNA helicasa cuya localización se ha predicho en el cloroplasto (Figura 41). Las RNA helicasas son enzimas que utilizan la energía liberada en la hidrólisis de ATP para desenrollar RNA de doble hélice, y por tanto están potencialmente implicadas en cualquier aspecto del metabolismo del RNA, incluyendo procesos biológicos esenciales como transcripción, *splicing* de RNA, biogénesis del ribosoma, traducción, transporte y de degradación de RNA (de la Cruz *et al.*, 1999; Rocak y Linder, 2004; Cordin *et al.*, 2006). La mayoría de las RNA helicasas se clasifican en dos superfamilias (SF1 y SF2) de acuerdo a sus características estructurales y su secuencia de aminoácidos. Las DEAD-box RNA helicasas (DBRHs) constituyen el grupo más numeroso dentro de la SF2, y se caracterizan por poseer nueve dominios conservados y distintas extensiones de secuencia en N- y C-terminal que determinan su especificidad por el sustrato, su localización subcelular y la interacción con otros componentes celulares (Cordin *et al.*, 2006; Fairman-Williams *et al.*, 2010;

Byrd y Raney, 2012). Las DBRHs están presentes en todos los organismos, tanto procariotas como eucariotas, incluyendo las plantas (Rocak y Linder, 2004).

En el genoma de *Arabidopsis thaliana* hay 58 DBRHs anotadas (Aubourg *et al.*, 1999; Mingam *et al.*, 2004), las cuales están implicadas en diversas funciones celulares, la regulación del desarrollo vegetal y la respuesta a estreses abióticos y bióticos (Mingam *et al.*, 2004; Kant *et al.*, 2007; Hsu *et al.*, 2014; Bush *et al.*, 2015). Por ejemplo, la DBRH HS3 está implicada en la acumulación de mRNA plastidiales durante el desarrollo de la semilla y el crecimiento de la plántula (Kanai *et al.*, 2013). Un análisis *in silico* identificó 51 DBRHs en el genoma de arroz, la mayoría de ellas sin caracterización funcional (Xu *et al.*, 2013b). Recientemente, Huang *et al.* (2016) determinaron que dos de estas DBRHs en arroz, OsRH2 y OsRH34, homólogas al factor de iniciación 4AIII de eucariotas, regulan el crecimiento y desarrollo de la planta. Otra DBRH, OsSUV3, está implicada en la tolerancia a salinidad en arroz mediante la mejora de la fotosíntesis y los sistemas antioxidantes (Tuteja *et al.*, 2013). En el genoma de tomate, se han identificado 42 genes que codifican DBRHs, pero la función de la mayoría de ellas aún está por determinar (Xu *et al.*, 2013a). En nuestro estudio, se corroboró que *SIDEAD39* era responsable del fenotipo mutante mediante la sobreexpresión del gen en plantas *res* (líneas de complementación), mostrando estas líneas fenotipo WT, tanto a nivel macroscópico como microscópico (Figura 43).

4.2.2. SIDEAD39 está implicada en el procesamiento del RNA ribosomal 23S del cloroplasto

La biogénesis del ribosoma es un proceso biológico complejo en el que están involucradas distintas enzimas, entre ellas las DBRHs (Rocak y Linder, 2004). Los plastidios poseen ribosomas que se asemejan a los de los organismos procariotas (Harris *et al.*, 1994). El RNA ribosomal (rRNA) se sintetiza como un transcrito precursor de gran longitud que posteriormente se escinde y procesa para generar las moléculas maduras de rRNA de menor tamaño.

En *Arabidopsis*, se han identificado hasta la fecha cuatro DBRHs implicadas en la biogénesis del ribosoma del cloroplasto: RH3, RH22, RH39 y RH50. La función de RH3 es el ‘*splicing*’ de los intrones del grupo II del rRNA 23S y de los RNAs de proteínas ribosomales (Asakura *et al.*, 2012). RH50 está implicada en la maduración del

rRNA 23S y 4.5S (Paieri *et al.*, 2018). RH22 interacciona con un precursor inmaduro del rRNA 23S y con la proteína ribosomal RPL24, y su inhibición da lugar a cloroplastos con un desarrollo aberrante (Chi *et al.*, 2012). RH39 interacciona con el rRNA 23S del cloroplasto y promueve su maduración (Nishimura *et al.*, 2010). El precursor del rRNA 23S tiene una longitud de 2,9 kb, la cual se fragmenta en moléculas maduras de 0,5, 1,1 y 1,3 kb, y RH39 está implicada en la generación de los fragmentos maduros de 1,1 y 1,3 kb (Nishimura *et al.*, 2010). En el mutante *res* se observó una maduración anormal del rRNA 23S (Figura 49), lo que sugiere que SIDEAD39 podría cumplir una función similar en tomate a la de RH39 en *Arabidopsis*. En resumen, la normalización del fenotipo mutante está relacionada con la recuperación parcial del procesamiento correcto del rRNA 23S cloroplastidial.

Las proteínas DBRHs poseen nueve dominios de aminoácidos conservados (Cordin *et al.*, 2006). Los dominios Q, I y II están implicados en la unión a ATP; Ia, Ib, IV y V son necesarios para la unión a RNA; el dominio III se encarga de la hidrólisis de ATP y la función del dominio VI es hidrolizar ATP y desenrollar el RNA. Estos nueve dominios están presentes y altamente conservados en las RH39 homólogas en otras especies vegetales, aunque las secuencias de aminoácidos no son completamente idénticas entre ellas (Nishimura *et al.*, 2010). Así, el alineamiento entre AtRH39 y SIDEAD39, con un 65% de homología de secuencia, reveló un alto grado de conservación en los nueve dominios de aminoácidos, puesto que sólo se observaron polimorfismos en los dominios Q y Ib (Figura 42). La mutación en *res* se localiza en el dominio I, y causa la sustitución de un aminoácido conservado de Gly por Asp. Por tanto, cabría esperar que la proteína mutada estuviera alterada en su capacidad de unión a ATP, o presentar una estabilidad estructural reducida. En el futuro, se llevarán a cabo ensayos para estudiar la actividad de la proteína mutada.

4.2.3. SIDEAD39 juega un papel clave en la regulación del balance desarrollo-tolerancia a estrés

El silenciamiento de *SIDEAD39* en las líneas RNAi produjo plantas con un crecimiento retardado, clorosis foliar y alteraciones estructurales similares a las observadas previamente en el mutante *res* (Figura 46). No obstante, se observaron distintos grados de severidad en el fenotipo de las líneas RNAi, los cuales parecen estar relacionados con el nivel de silenciamiento génico. Así, la línea RNAi-2, que presentó el

silenciamiento de *SIDEAD39* más alto (expresión relativa de 0,01 respecto a WT), no fue capaz de sobrevivir tras varias semanas de aclimatación *in vivo*. Nuestros resultados están en consonancia con los obtenidos para otros mutantes de DBRHs cloroplastidiales en otras especies, en los que la función alterada del gen ha dado lugar a plantas de fenotipo clorótico y alteraciones en el desarrollo, mientras que la pérdida de función total ha resultado letal (Asakura *et al.*, 2012; Gu *et al.*, 2014). Un ejemplo es el silenciamiento génico mediante microRNA de la DBRH cloroplastidial *AtRH3* en *Arabidopsis*, que dio lugar a plantas con distintos grados de clorosis e inhibición del desarrollo correlacionados con el nivel de expresión de *AtRH3* (Gu *et al.*, 2014). En conjunto, nuestros resultados indican que *SIDEAD39* tiene un papel importante en el desarrollo vegetal normal en tomate, y parece ser necesario para la viabilidad de la planta.

En tomate, la función de las DBRHs es prácticamente desconocida. Recientemente, en un estudio genómico a gran escala de la familia génica de las RHs de tomate, Xu *et al.* (2013a) especularon que las DBRHs podrían jugar un papel clave en la respuesta a estreses bióticos y abióticos. Más recientemente, Zhu *et al.* (2015) identificaron y caracterizaron dos DBRHs localizadas en el núcleo, *SIDEAD30* y *SIDEAD31*, señalando a *SIDEAD31* como un regulador positivo de la tolerancia a salinidad y sequía. Sin embargo, hasta la fecha no se había identificado en tomate ninguna DBRH cloroplastidial implicada en la respuesta a estrés abiótico. En este estudio, se analizaron los niveles de expresión de las nueve DBRHs (incluyendo *SIDEAD39*) que poseen un péptido señal que predice su localización en el cloroplasto (Xu *et al.*, 2013a), tanto en control como en estrés salino. Nuestros resultados revelaron una mayor expresión constitutiva de *SIDEAD35*, *SIDEAD33*, *SIDEAD17* y *SIDEAD23* en los genotipos en los que la función de *SIDEAD39* está alterada (Tabla 26, Figura 50). También se observó la inducción en salinidad de la expresión de *SIDEAD35*, *SIDEAD17* y *SIDEAD5* en la 3ª hoja desarrollada del mutante, además de una marcada inducción de la expresión de *SIDEAD33* en *res*, RNAi-9 y WT (Figura 50). El papel de estas DBRHs cloroplastidiales en tomate es desconocido y por tanto sería interesante estudiar su posible función en la tolerancia a salinidad, además de comprobar si alguna de ellas comparte funcionalidad con *SIDEAD39*. En este sentido, un gen candidato destacable es *SIDEAD33*, ya que su inducción específica en WT en salinidad sugiere que podría tener una función en la respuesta a este estrés, y además se sobreexpresa tanto en *res* como en

RNAi-9 en estrés salino, por lo que podría tener un papel en la complementación de la función de SIDEAD39. Por otro lado, un estudio reciente que implica a la helicasa RH50 en la maduración del rRNA 23S y 4.5S, señala que la funcionalidad de esta DBRH es parcialmente redundante con la de GUN1, una proteína cloroplastidial implicada en la señalización del plasto al núcleo (retrógrada) y no relacionada filogenéticamente con las DBRHs (Paieri *et al.*, 2018). Por tanto, no se puede descartar la posibilidad de que la función de la proteína SIDEAD39 mutada sea rescatada en salinidad por otra proteína no DBRH.

Las plantas utilizan los cloroplastos y mitocondrias como sensores capaces de detectar y responder ante distintos estreses ambientales. Ante determinados estímulos intra- y extracelulares, estos orgánulos emiten señales ‘retrógradas’ que modifican la expresión génica nuclear con el fin de mantener la homeostasis tanto a nivel celular como en el organismo (Sun y Guo, 2016; Woodson, 2016). Las señales retrógradas se clasifican de manera general en dos grupos: las biogénicas, que regulan el desarrollo de los orgánulos, y las operacionales, que controlan la adaptación a situaciones de estrés (Pogson *et al.*, 2008). Dado el papel de las DBRHs cloroplastidiales en el metabolismo del RNA, y el hecho de que están codificadas por genes nucleares, cabe esperar que estas proteínas jueguen un papel importante en la señalización retrógrada y, con ello, en la adaptación al estrés (Nawaz y Kang, 2017). El análisis transcriptómico demostró que las plantas que tienen SIDEAD39 mutada (*res*) presentan una activación constitutiva en la raíz de genes de respuesta a distintos estreses (Figuras 37 y 38), entre ellos genes implicados en la síntesis y la señalización de JA (Tabla 18). En los cloroplastos se producen reacciones clave de la síntesis de muchas hormonas vegetales, entre ellas el JA, que es una molécula clave en la regulación del balance desarrollo-defensa (Meldau *et al.*, 2012; Mitra y Baldwin, 2014; Westernack y Hause, 2013). Es interesante señalar que la alteración constitutiva de genes relacionados con el metabolismo de JA y la acumulación del mismo se observa en las raíces de *res* y no en las hojas (García-Abellán *et al.*, 2015), lo que sugiere un efecto diferencial de la mutación en cada tejido. De hecho, las alteraciones de expresión génica en el mutante fueron mayores en las raíces en ausencia de estrés que en las hojas, mientras que la tendencia fue opuesta en estrés salino (Figura 36). Los cambios transcriptómicos ocurridos en salinidad favorecieron la desaparición de las alteraciones estructurales y fisiológicas del mutante y un mayor crecimiento respecto a la condición control (Figura 35), ilustrando la

transferencia de recursos energéticos de la defensa hacia el desarrollo. Por tanto, nuestros resultados indican que SIDEAD39 juega un papel importante en la coordinación del balance desarrollo-defensa y subrayan la importancia del cloroplasto en la regulación de la homeostasis celular.

CONCLUSIONES

VI. CONCLUSIONES

CAPÍTULO I. Respuesta fenotípica, fisiológica y molecular de la especie silvestre *S. pennellii* a los estreses hídrico y salino

1. El análisis transcriptómico comparativo entre tomate cultivado y *S. pennellii* en condiciones de sequía revela que la tolerancia de la especie silvestre al estrés hídrico está asociada tanto a diferencias de expresión constitutivas como a la alteración de la expresión de genes específicos en condiciones de estrés. Entre estos últimos, destacan aquellos implicados en la asimilación de N, el ciclo GOGAT/GS y GABA-*shunt*, además de genes involucrados en el metabolismo y la señalización de las hormonas JA y ET. También se observó la inducción en *S. pennellii* de genes relacionados con la homeostasis redox, lo que indica que la especie silvestre es capaz de controlar el daño oxidativo de manera más eficiente que el tomate cultivado.
2. Se ha demostrado que existe un mecanismo común en la tolerancia de *S. pennellii* a sequía y salinidad: el control de la pérdida de agua a través de las hojas. Las adaptaciones anatómicas de las hojas de la especie silvestre en condiciones de estrés incluyen la reducción de la densidad estomática y el engrosamiento de la pared celular. Además, la optimización del estado hídrico de *S. pennellii* también está relacionada con la regulación de genes implicados en el transporte de agua (acuaporinas).
3. En estrés salino, el comportamiento de *S. pennellii* como especie “incluidora” de Na^+ en la parte aérea de la planta se debe a la regulación coordinada de los genes *SOS1* y *HKT1;2*. Además, el gran tamaño de las células de las hojas de la especie silvestre, unido a la mayor expresión de los genes *NHX3* y *NHX4*, reflejan una compartimentación eficiente del Na^+ en la vacuola.
4. El fenotipo observado en el mutante *pennellii salt hypersensitive (psh)* está relacionado con un transporte masivo de agua y Na^+ a la parte aérea. Éste parece deberse, por una parte, a un fenómeno de co-transporte regulado por acuaporinas como PIP2;1 y, por otra, a una alteración de la expresión de *HKT1;2*, tanto en raíz

Conclusiones

como en la parte aérea. Ambos mecanismos sugieren que la alta sensibilidad de *psh* al estrés salino es debida a la saturación de la capacidad de acumulación de Na⁺ en la vacuola, causando citotoxicidad como consecuencia de su acumulación en el citoplasma de la célula.

CAPÍTULO II. Análisis transcriptómico del mutante de tomate *res* (*restored cell structure by salinity*) e identificación del gen responsable del fenotipo mutante

5. La inhibición del desarrollo del mutante *res* parece ser una consecuencia del coste energético que supone la alteración constitutiva de un elevado número de genes en la raíz, entre ellos genes del metabolismo de hormonas, señalización, factores de transcripción y genes relacionados con la respuesta a estrés. De acuerdo con esto, en estrés salino se observó la atenuación de las diferencias de expresión génica en las raíces del mutante coincidiendo con su recuperación fenotípica.
6. En hoja, por otro lado, la respuesta de *res* a la salinidad incluye cambios de expresión de genes que parecen ser claves en la tolerancia, tales como *GIGANTEA1*, considerado un regulador negativo de la tolerancia a salinidad, los genes *Rubisco Activasa 1 (RCA1)* y *Alternativa Oxidasa 1A (AOX1A)*, con un papel positivo en la eficiencia de la fotosíntesis, genes de inhibidores de proteasas como *MPI* y los factores de transcripción *WRKY39* y *MYB14*. Considerados en conjunto, los resultados de este estudio transcriptómico ofrecen una visión global de los cambios a nivel molecular que tienen lugar en el balance desarrollo-defensa, además de identificar posibles determinantes genéticos de la tolerancia a salinidad en tomate.
7. La proteína DEAD-box RNA helicasa *SIDEAD39* es responsable del fenotipo mutante *res*. *SIDEAD39* tiene homología con *AtDEAD39* de *Arabidopsis*, y al igual que ella está implicada en la maduración del rRNA 23S del ribosoma del cloroplasto, siendo esencial en la biogénesis de este orgánulo.
8. En las líneas de silenciamiento del gen *SIDEAD39* se observó un fenotipo con las mismas características mostradas por *res*, alteraciones en el desarrollo sin estrés y normalización con el estrés salino. Además, la recuperación del fenotipo normal del

mutante *res* y las líneas RNAi con la salinidad podría deberse a la complementación de la función de SIDEAD39 por parte de otra proteína DEAD-box cloroplastidial, siendo SIDEAD33 una posible candidata.

BIBLIOGRAFÍA

- Achard, P., Vriezen, W. H., Van der Straeten, D., Harberd, N. P.** (2003). Ethylene regulates Arabidopsis development via the modulation of DELLA protein growth repressor function. *Plant Cell* **15**: 2816-2825.
- Achard, P., Cheng, H., De Grauwe, L. et al.** (2006). Integration of plant responses to environmentally activated phytohormonal signals. *Science* **311**: 91-94.
- Ainsworth, E.A., Ort, D.R.** (2010). How do we improve crop production in a warming world? *Plant Physiology* **154**: 526-530.
- Alarcon, J. J., Sánchez-Blanco, M. J., Bolarín, M. C., Torrecillas, A.** (1993). Water relations and osmotic adjustment in *Lycopersicon esculentum* and *L. pennellii* during short-term salt exposure and recovery. *Physiologia Plantarum* **89**: 441–447.
- Albaladejo, I., Meco, V., Plasencia, F., Flores, F.B., Bolarín, M.C., Egea, I.** (2017). Unravelling the strategies used by the wild tomato *Solanum pennellii* to confront salt stress: from leaf anatomical adaptations to molecular responses. *Environmental and Experimental Botany* **135**: 1-12.
- Ali, Z., Park, H.C., Ali, A., et al.** (2012). *TsHKT1;2*, a *HKT1* homolog from the extremophile *Arabidopsis* relative *Thellungiella salsuginea*, shows K⁺ specificity in the presence of NaCl. *Plant Physiology* **158**: 1463-1474.
- Almeida, P., de Boer G.J., de Boer, A.H.** (2014). Differences in shoot Na⁺ accumulation between two tomato species are due to differences in ion affinity of HKT1;2. *Journal of Plant Physiology* **171**: 438–447.
- Apel, K., Hirt, H.** (2004). Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress and signal transduction. *Annual Review of Plant Biology* **55**: 373-399.
- Apse, M.P., y Blumwald, E.** (2007). Na⁺ transport in plants. *FEBS letters* **581**: 2247-2254.
- Arms, E. M., Yan, Z., St Clair D. A.** (2017). Differential transcriptional regulation in roots of tomato near-isogenic lines in response to rapid-onset water stress. *Frontiers in Plant Science* **8**: 166.
- Arnholdt-Schmitt, B., Costa, J.H., de Melo, D.F.** (2006). AOX—a functional marker for efficient cell reprogramming under stress? *Trends in Plant Science* **11**: 281–287.
- Asakura, Y., Galarneau, E., Watkins, K.P., Barkan, A., van Wijk, K.J.** (2012). Chloroplast RH3 DEAD box RNA helicases in maize and Arabidopsis function in splicing of specific group II introns and affect chloroplast ribosome biogenesis. *Plant Physiology* **159**: 961–974.
- Asins, M.J., Villalta, I., Aly, M.M., et al.** (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.

- Asins, M.J., Raga, V., Roca, D., Belver, A., Carbonell, E.A.** (2015). Genetic dissection of tomato rootstock effects on scion traits under moderate salinity. *Theoretical and Applied Genetics* **128**: 667-679.
- Atarés, A., Moyano, E., Morales, B., et al.** (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, N.J., Urwin, P.E.** (2012). The interaction of plant biotic and abiotic stresses: from genes to the field. *Journal of Experimental Botany* **63**: 3523-3543.
- Aubourg, S., Kreis, M., Lecharny, A.** (1999). The DEAD box RNA helicase family in *Arabidopsis thaliana*. *Nucleic Acids Research* **27**: 628-636.
- Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., et al.** (1993). Current Protocols in Molecular Biology. John Wiley & Sons, New York.
- Bai, Y., Lindhout, P.** (2007). Domestication and breeding of tomatoes: what have we gained and what can we gain in the future? *Annals of Botany* **100**: 1085-1094.
- Bairu, M., Aremu, A., Van Staden, J.** (2011) 'Somaclonal variation in plants: causes and detection methods. *Plant Growth Regulation* **63**: 147-173.
- Barragán, V., Leidi, E.O., Andrés, Z., et al.** (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. Sunkar, R.** (2005). Drought and salt tolerance in plants. *Critical Reviews in Plant Sciences* **24**: 23-58.
- Battaglia, M., Olvera-Carrillo, Y., Garcíarrubio, A., Campos, F., Covarrubias, A.A.** (2008). The enigmatic LEA proteins and other hydrophilins. *Plant Physiology* **148**: 6-24.
- Bauchet, G., Causse, M.** (2012). Genetic diversity in tomato (*Solanum lycopersicum*) and its wild relatives. *Intech Open Access Publisher*.
- Baulcombe, D.C., Saunders, G.R., Bevan, M.W., Mayo, M.A., Harrison, B.D.** (1986). Expression of biologically active viral satellite RNA from the nuclear genome of transformed plants. *Nature* **321**: 446-449.
- Bedinger, P.A., Chetelat, R.T., McClure, B., et al.** (2011). Interspecific reproductive barriers in the tomato clade: opportunities to decipher mechanisms of reproductive isolation. *Sexual Plant Reproduction* **24**: 171-187.
- Benjamini, Y., Hochberg Y.** 1995. Controlling the false discovery rate - a practical and powerful approach to multiple testing. *Journal of the Royal Statistical Society, Series B-methodological* **57**: 289-300.
- Bergey, D.R., Kandel, R., Tyree, B.K., Dutt, M., Dhekney, S.A.** (2014). The role of calmodulin and related proteins in plant cell function: an ever-thickening plot.

Springer Science Reviews **2**: 145-59.

- Bergougnoux, V.** (2014). The history of tomato: from domestication to biopharming. *Biotechnology Advances* **32**: 170-189.
- Berthomieu, P., Conéjéro, G., Nublat, A., et al.** (2003). Functional analysis of *AtHKT1* in *Arabidopsis* shows that Na⁺ recirculation by the phloem is crucial for salt tolerance. *The EMBO Journal* **22**: 2004-2014.
- Bertl, A., Reid, J.D., Sentenac, H., Slayman, C.L.** (1997). Functional comparison of plant inward-rectifier channels expressed in yeast. *Journal of Experimental Botany* **48**: 405- 413.
- Bhat, J.Y., Thieulin-Pardo, G., Hartl, F.U., Hayer-Hartl, M.** (2017). Rubisco activases: AAA+ chaperones adapted to enzyme repair. *Frontiers in Molecular Biosciences* **4**: 20.
- Bies-Etheve, N., Gaubier-Comella, P., Debures, A., et al.** (2008). Inventory, evolution and expression profiling diversity of the LEA (late embryogenesis abundant) protein gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Molecular Biology* **67**: 107-124.
- Blumwald, E., Aharon, G.S., Apse, M.P.** (2000). Sodium transport in plant cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes* **1465**: 140-151.
- Bolarín, M., Fernandez, F., Cruz, V., Cuartero, J.** (1991). Salinity tolerance in four wild tomato species using vegetative yield-salinity response curves. *Journal of the American Society for Horticultural Science* **116**: 286-290.
- Bolger, A., Scossa, F., Bolger, M.E., et al.** (2014). The genome of the stress-tolerant wild tomato species *Solanum pennellii*. *Nature Genetics* **46**: 1034-1039.
- Boughalleb, F., Denden, M., Tiba, B.B.** (2009). Anatomical changes induced by increasing NaCl salinity in three fodder shrubs, *Nitraria retusa*, *Atriplex halimus* and *Medicago arborea*. *Acta Physiologiae Plantarum* **31**: 947-960.
- Boursiac, Y., Chen, S., Luu, D.-T., Sorieul, M., van des Dries, N., Maurel, C.** (2005). Early effects of salinity on water transport in *Arabidopsis* roots. Molecular and cellular features of aquaporin expression. *Plant Physiology* **139**: 790-805.
- Bracher, A., Whitney, S.M., Hartl, F.U., Hayer-Hartl, M.** (2017). Biogenesis and metabolic maintenance of Rubisco. *Annual Review of Plant Biology* **68**: 29–60.
- Bray, E. A.** (2004). Genes commonly regulated by water-deficit stress in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Experimental Botany* **55**: 2331–2341.
- Bush, M.S., Crowe, N., Zheng, T., Doonan, J.H.** (2015). The RNA helicase, eIF4A-1, is required for ovule development and cell size homeostasis in *Arabidopsis*. *The Plant Journal* **84**: 989-1004.
- Bustin, S.A., Nolan, T.** (2004). Pitfalls of quantitative real-time reverse-transcription

- polymerase chain reaction. *Journal of Biomolecular Techniques* **15**: 155-166.
- Byrd, A.K., Raney, K.D.** (2012). Superfamily 2 helicases. *Frontiers in Bioscience (Landmark edition)* **17**: 2070-2088.
- Byrt, C.S., Zhao, M., Kourghi, M., et al.** (2016). Non-selective cation channel activity of aquaporin AtPIP2;1 regulated by Ca²⁺ and pH. *Plant Cell and Environment* **40**: 802-815.
- Cadahia, C.** (1995). Fertilización. En: El cultivo del tomate, Nuez, F. (Ed), Ediciones Mundi-Prensa, Madrid, pp. 169- 187.
- Campbell, S.A., Close, T.J.** (1997). Dehydrins: genes, proteins, and associations with phenotypic traits. *New Phytologist* **137**: 61-74.
- Campos, J.F., Cara, B., Pérez-Martín, F., et al.** (2016). The tomato mutant *arsl* (*altered response to salt stress 1*) identifies an R1-type MYB transcription factor involved in stomatal closure under salt acclimation. *Plant Biotechnology Journal* **14**: 1345–1356.
- Capel, C., Fernández del Carmen, A., Alba, J.M., et al.** (2015). Wide-genome QTL mapping of fruit quality traits in a tomato RIL population derived from the wild-relative species *Solanum pimpinellifolium* L. *Theoretical and Applied Genetics* **128**: 2019-2035.
- Capel, C., Yuste-Lisbona, F.J., López-Casado, G., et al.** (2017). Multi-environment QTL mapping reveals genetic architecture of fruit cracking in a tomato RIL *Solanum lycopersicum* × *S. pimpinellifolium* population. *Theoretical and Applied Genetics* **130**: 213-22.
- Casson, S. Gray, J. E.** (2008). Influence of environmental factors on stomatal development. *New Phytologist* **178**: 9-23.
- Causse, M., Damidaux, R. Rousselle, P.** (2006). Traditional and enhanced breeding for quality traits in tomato. *Genetic improvement of Solanaceous crops* **2**: 153-192.
- Cheng, M.-C., Liao, P.-M., Kuo, W.-W., Lin, T.-P.** (2013). The Arabidopsis ETHYLENE RESPONSE FACTOR1 regulates abiotic stress-responsive gene expression by binding to different *cis*-acting elements in response to different stress signals. *Plant Physiology* **162**: 1566–1582.
- Chi, W., He, B., Mao, J., Li, Q., Ma, J., Ji, D., Zhang, L.** (2012). The function of RH22, a DEAD RNA Helicase, in the biogenesis of the 50S ribosomal subunits of Arabidopsis chloroplasts. *Plant Physiology* **158**: 693–707.
- Chinnusamy, V., Schumaker, K., Zhu, J.-K.** (2004). Molecular genetic perspectives on cross-talk and specificity in abiotic stress signalling in plants. *Journal of Experimental Botany* **55**: 225–236.

- Cho, C.-W., Lee H.-J., Chung, E., et al.** (2007). Molecular characterization of the soybean L-asparaginase gene induced by low temperature stress. *Molecules and Cells* **23**: 280-286.
- Claeys, H., Inzé, D.** (2013). The agony of choice: how plants balance growth and survival under water-limiting conditions. *Plant Physiology* **162**: 1768-1779.
- Clauw, P., Coppens, F., De Beuf, K., et al.** (2015). Leaf responses to mild drought stress in natural variants of *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **167**: 800-816.
- Colmer, T., Munns, R., Flowers, T.** (2006). Improving salt tolerance of wheat and barley: future prospects. *Animal Production Science* **45**: 1425-1443.
- Cominelli, E., Galbiati, M., Vavasseur, A., Conti, L., Sala, T., Vuylsteke, M., Leonhardt, N., Dellaporta, S.L. Tonelli, C.** (2005). A guard-cell-specific MYB transcription factor regulates stomatal movements and plant drought tolerance. *Current Biology* **15**: 1196-1200.
- Cong, L., Ran, F.A., Cox, D., et al.** (2013). Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science* **339**: 819-823.
- Cordin, O., Banroques, J., Tanner, N.K., Linder, P.** (2006). The DEAD-box protein family of RNA helicases. *Gene* **367**: 17-37.
- Costa J.** (2004). Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a tiempo real. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica* **22**: 299-305.
- Craig Plett, D., Møller, I.S.** (2010). Na⁺ transport in glycophytic plants: what we know and would like to know. *Plant, Cell and Environment* **33**: 612-626.
- Cuartero, J., Fernández-Muñoz, R., González-Fernández, J.** (1995). Estreses abióticos. En: El cultivo del tomate, Nuez, F. (Ed), Mundi-Prensa, Madrid, España, pp. 351- 384.
- Cuartero, J., Bolarín, M.C., Asins, M.J., Moreno, V.** (2006). Increasing salt tolerance in the tomato. *Journal of Experimental Botany* **57**: 1045-1058.
- Dajic, Z.** (2006). Salt stress. En: Physiology and Molecular Biology of stress tolerance in plants, Madhava Rao, K.V., Raghavendra, A.S., Janardhan Reddy, K. (Eds.) Springer, pp. 41-99.
- Dalal, M., Tayal, D., Chinnusamy, V., Bansal, K.C.** (2009). Abiotic stress and ABA-inducible Group 4 LEA from *Brassica napus* plays a key role in salt and drought tolerance. *Journal of Biotechnology* **139**: 137-145.
- Davenport, R.J., Muñoz-Mayor, A., Jha, D., Essah, P.A., Rus, A., Tester, M.** (2007). The Na⁺ transporter *AtHKT1;1* controls retrieval of Na⁺ from the xylem in *Arabidopsis*. *Plant, Cell and Environment* **30**: 497-507.
- De Candolle, A.** (1886). Origin of cultivated plants. New York: Hafner Publishing Company.

- De la Cruz, J., Kressler, D., Linder, P.** (1999). Unwinding RNA in *Saccharomyces cerevisiae*: DEAD-box proteins and related families. *Trends in Biochemical Sciences* **24**:192-198.
- Deinlein, U., Stephan, A.B., Horie, T., Luo, W., Xu, G., Schroeder, J.I.** (2014). Plant salt-tolerance mechanisms. *Trends in Plant Science* **19**: 371–379.
- Des Marais, D.L., McKay, J.K., Richards, J.H., Sen, S., Wayne, T., Juenger, T.E.** (2012). Physiological genomics of response to soil drying in diverse Arabidopsis accessions. *Plant Cell* **24**: 893-914.
- Dinakar, C., Vishwakarma, A., Raghavendra, A.S., Padmasree, K.** (2016). Alternative oxidase pathway optimizes photosynthesis during osmotic and temperature stress by regulating cellular ROS, malate valve and antioxidative systems. *Frontiers in Plant Science* **7**: 68.
- Ding, Z.J., Yan, J.Y., Xu, X.Y., et al.** (2014). Transcription factor WRKY46 regulates osmotic stress responses and stomatal movement independently in Arabidopsis. *The Plant Journal* **79**: 13-27.
- Driscoll, S., Prins, A., Olmos, E., Kunert, K., Foyer, C.** (2006). Specification of adaxial and abaxial stomata, epidermal structure and photosynthesis to CO₂ enrichment in maize leaves. *Journal of Experimental Botany* **57**: 381-390.
- Edgar, R., Domrachev, M., Lash, A.E.** (2002). Gene Expression Omnibus: NCBI gene expression and hybridization array data repository. *Nucleic Acids Research* **30**: 207-210.
- Egea I., Pineda B., Ortíz-Atienza A., et al.** (2018a). The SlCBL10 calcineurin B-like protein ensures plant growth under salt stress by regulating Na⁺ and Ca²⁺ homeostasis. *Plant Physiology* **176**: 1676-1693.
- Egea I., Albaladejo I., Meco V., et al.** (2018b). The drought-tolerant *Solanum pennellii* regulates leaf water loss and induces genes involved in amino acid and ethylene/jasmonate metabolism under dehydration. *Scientific Reports* **8**: 2791.
- Ehsanzadeh, P., Nekoonam, M.S., Azhar, J.N., Pourhadian, H., 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.
- Engineer, C.B., Hashimoto-Sugimoto, M., Negi, J., et al.** (2014). Carbonic anhydrases, EPF2 and a novel protease mediate CO₂ control of stomatal development. *Nature* **513**: 246-250.
- Escobar-Bravo, R., Alba, J.M., Pons, C., et al.** (2016). A Jasmonate-inducible defense trait transferred from wild into cultivated tomato establishes increased whitefly resistance and reduced viral disease incidence. *Frontiers in Plant Science* **7**:1732.
- Esquinas-Alcázar, J.T.** (1981). Genetic Resources of tomatoes and wild relatives: a global report. International Board for Plant Genetic Resources (IBPGR) Secretariat, Rome, Italy, pp. 1-73.

- Esquinas-Alcázar, J.T., Nuez, F.** (1995). Situación taxonómica, domesticación y difusión del tomate. En: El cultivo del tomate, Nuez, F. (Ed.). Ediciones Mundi-Prensa, Madrid, pp. 15-43.
- Evans, J. R., Kaldenhoff, R., Genty, B. Terashima, I.** (2009). Resistances along the CO₂ diffusion pathway inside leaves. *Journal of Experimental Botany* **60**: 2235-2248.
- Fairman-Williams, M.E., Guenther, U-P., Jankowsky, E.** (2010) SF1 and SF2 helicases: family matters. *Current Opinion in Structural Biology* **20**: 313-324.
- FAO.** (2009). High level expert forum - how to feed the world in 2050. Economic and social development department. Rome: Food and Agricultural Organization of the United Nations.
- FAOSTAT.** (2016). Statistics division of the Food and Agriculture Organization of the United Nations. Disponible en: <http://faostat3.fao.org>
- Fernández-Lozano, A., Yuste-Lisbona, F.J., Pérez-Martín, F., et al.** (2015). Mutation at the tomato *excessive number of floral organs* (*ENO*) locus impairs floral meristem development, thus promoting an increased number of floral organs and fruit size. *Plant Science* **232**: 41-48.
- Flowers, T.J.** (2004). Improving crop salt tolerance. *Journal of Experimental Botany* **55**: 307-319.
- Flowers, T.J., Colmer, T.D.** (2008). Salinity tolerance in halophytes. *New Phytologist* **179**: 945-963.
- Flowers, T.J., Munns, R., Colmer, T.D.** (2015). Sodium chloride toxicity and the cellular basis of salt tolerance in halophytes. *Annals of Botany* **115**: 419-431.
- Foolad, M.R.** (2007). Genome mapping and molecular breeding of tomato. *International Journal of Plant Genomics* **2007**: 64358.
- Franco-Navarro, J.D., Brumós, J., Rosales, M.A., Cubero-Font, P., Talón, M., Colmenero-Flores, J.M.** (2016). Chloride regulates leaf cell size and water relations in tobacco plants. *Journal Experimental Botany* **67**: 873-891.
- Fricke, W.** (2015). The significance of water co-transport for sustaining transpirational water flow in plants: a quantitative approach. *Journal of Experimental Botany* **66**: 731-739.
- Fricke, W.** (2016). Water transport and energy. *Plant, Cell and Environment* **40**: 977-994.
- Fricke, W., Akhiyarova, G., Wei, W., et al.** (2006). The short-term growth response to salt of the developing barley leaf. *Journal of Experimental Botany* **57**: 1079-1095.
- Fu, H.H., Luan, S.** (1998). AtKuP1: a dual-affinity K⁺ transporter from Arabidopsis. *The Plant Cell* **10**: 63-73.

- Gálvez, F.J., Baghour, M., Hao, G., Cagnac, O., Rodriguez-Rosales, M.P., 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-Abellán, J.O., Egea, I., Pineda, B., et al.** (2014). Heterologous expression of the yeast *HAL5* gene in tomato enhances salt tolerance by reducing shoot Na^+ accumulation in the long term. *Physiologia Plantarum* **152**: 700–713.
- García-Abellán, J.O., Fernández-García, N., López-Berenguer, C., et al.** (2015). The tomato *res* mutant which accumulates JA in roots in non-stressed conditions restores cell structure alterations under salinity. *Physiologia Plantarum* **155**: 296–314.
- García-Abellán, J.O., Albaladejo, I., Egea, I., et al.** (2017). The phenotype alterations showed by the *res* tomato mutant disappear when the plants are grown under semi-arid conditions: is the *res* mutant tolerant to multiple stresses? *Plant Signaling and Behavior* **12**: e1146847.
- Gaufichon, L., Reisdorf-Crena, M., Rothstein, S.J., Chardon, F., Suzuki, A.** (2010). Biological functions of asparagine synthetase in plants. *Plant Science* **179**: 141–153.
- Gaxiola, R.A., Li, J., Undurraga, S., et al.** (2001). Drought-and salt-tolerant plants result from overexpression of the AVP1 H^+ -pump. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **98**: 11444-11449.
- Gaymard, F., Pilot, G., Lacombe B., et al.** (1998). Identification and disruption of a plant Shaker-like outward channel involved in K^+ release into the xylem sap. *Cell* **94**: 647-655.
- Gendron, J.M., Pruneda-Paz, J.L., Doherty, C.J., Gross, A.M., Kang, S.E., Kay, S.A.** (2012). Arabidopsis circadian clock protein, TOC1, is a DNA-binding transcription factor. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **109**: 3167-3172.
- Ghedira, R., De Buck, S., Van Ex, F., Angenon, G., 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.
- Gill, S.S., Tuteja, N.** (2010). Polyamines and abiotic stress tolerance in plants. *Plant, Signaling and Behavior* **5**: 26-33.
- Giménez, E., Pineda, B., Capel, J., et al.** (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.
- Gisbert, C., Rus, A.M., Bolarín, M.C., et al.** (2000). The yeast *HAL1* gene improves salt tolerance of transgenic tomato. *Plant Physiology* **123**: 392–402.
- Gleave, A.P.** (1992). A versatile binary vector system with a T-DNA organisational structure conducive to efficient integration of cloned DNA into the plant genome.

Plant Molecular Biology **20**: 1203–1207.

- Golldack, D., Li, C., Mohan, H., Probst, N.** (2014). Tolerance to drought and salt stress in plants: unraveling the signaling networks. *Frontiers in Plant Science* **5**: 151.
- Goyal, K., Walton, L.J., Tunnacliffe, A.** (2005). LEA proteins prevent protein aggregation due to water stress. *Biochemical Journal* **388**: 151-157.
- Grant, O.M., Chaves, M.M., Jones, H.G.** (2006). Optimizing thermal imaging as a technique for detecting stomatal closure induced by drought stress under greenhouse conditions. *Physiologia Plantarum* **127**: 507–518.
- Grebner, W., Stingl, N.E., Oenel, A., Mueller, M.J., Berger, S.** (2013). Lipoxygenase6-dependent oxylipin synthesis in roots is required for abiotic and biotic stress resistance of *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **161**: 2159-2170.
- Greenway, H., Munns, R.** (1980). Mechanisms of salt tolerance in non-halophytes. *Annual Review of Plant Physiology* **31**: 149-190.
- Grelet, J., Benamar, A., Teyssier, E., Avelange-Macherel, M.-H., Grunwald, D., 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.
- Gu, L., Xu, T., Lee, K., Lee, K.H., Kang, H.** (2014). A chloroplast-localized DEAD-box RNA helicase AtRH3 is essential for intron splicing and plays an important role in the growth and stress response in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology and Biochemistry* **82**: 309-318.
- Gupta, B., Huang, B.** (2014). Mechanism of salinity tolerance in plants: physiological, biochemical, and molecular characterization. *International Journal of Genomics* **2014**: article ID 701596.
- Halfter, U., Ishitani, M., Zhu, J.-K.** (2000). The *Arabidopsis* SOS2 protein kinase physically interacts with and is activated by the calcium-binding protein SOS3. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **97**: 3735-3740.
- Hancock, R.D., Morris, W.L., Ducreux, L.J.M.** (2014). Physiological, biochemical and molecular responses of the potato (*Solanum tuberosum* L.) plant to moderately elevated temperature. *Plant, Cell and Environment* **37**: 439-450.
- Hanin, M., Ebel, C., Ngom, M., Laplaze, L., Masmoudi, K.** (2016). New insights on plant salt tolerance mechanisms and their potential use for breeding. *Frontiers in Plant Science* **7**: 1787.
- Harris, E.H., Boynton, J.E., Gillham, N.W.** (1994). Chloroplast ribosomes and protein synthesis. *Microbiological Reviews* **58**: 700-754.
- Hasegawa, P.M.** (2013). Sodium (Na⁺) homeostasis and salt tolerance of plants. *Environmental and Experimental Botany* **92**: 19-31.

- Hasegawa, P.M., Bressan, R.A., Zhu, J.K., Bohnert, H.J.** (2000). Plant cellular and molecular responses to high salinity. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **51**: 463-499.
- Hauser, F., Horie, T.** (2010). A conserved primary salt tolerance mechanism mediated by HKT transporters: a mechanism for sodium exclusion and maintenance of high K^+/Na^+ ratio in leaves during salinity stress. *Plant, Cell and Environment* **33**: 552-565.
- Heidari, M., Mesri, F.** (2008). Salinity effects on compatible solutes, antioxidants enzymes and ion content in three wheat cultivars. *Pakistan Journal of Biological Sciences* **11**: 1385-1389.
- Hernández, J.A., Ferrer, M.A., Jiménez, A., Barceló, A.R., Sevilla, F.** (2001). Antioxidant systems and $O_2\cdot^-/H_2O_2$ production in the apoplast of pea leaves. Its relation with salt-induced necrotic lesions in minor veins. *Plant Physiology* **127**: 817-831.
- Hepworth, C., Doheny-Adams, T., Hunt, L., Cameron, D.D., Gray, J.E.** (2015). Manipulating stomatal density enhances drought tolerance without deleterious effect on nutrient uptake. *New Phytologist* **208**: 336–341.
- Hill, C.B., Taylor, J.D., Edwards, J., et al.** (2013). Whole-genome mapping of agronomic and metabolic traits to identify novel quantitative trait loci in bread wheat grown in a water-limited environment. *Plant Physiology* **162**: 1266-1281.
- Hoagland, D.R., Arnon, D.I.** (1950). The water-culture method for growing plants without soil. In: Agricultural Experiment Station Circular 347, Berkeley, The College of Agriculture University of California, 1-32.
- Hoel, B.O., Solhaug, K.A.** (1998). Effect of irradiance on chlorophyll estimation with the Minolta SPAD-502 leaf chlorophyll meter. *Annals of Botany* **82**: 389-392.
- Horie, T., Hauser, F., Schroeder, J.I.** (2009). HKT transporter-mediated salinity resistance mechanisms in *Arabidopsis* and monocot crop plants. *Trends in Plant Science* **14**: 660-668.
- Hsu, Y.-F., Chen, Y.-C., Hsiao, Y.-C., et al.** (2014). AtRH57, a DEAD-box RNA helicase, is involved in feedback inhibition of glucose-mediated abscisic acid accumulation during seedling development and additively affects pre-ribosomal RNA processing with high glucose. *The Plant Journal* **77**: 119-135.
- Hu, H., Boisson-Dernier, A., Israelsson-Nordström, M., et al.** (2010). Carbonic anhydrases are upstream regulators of CO_2 -controlled stomatal movements in guard cells. *Nature Cell Biology* **12**: 87-93.
- Hu, N., Tang, N., Yan, F., Bouzayen, M., Li, Z.** (2014). Effect of *LeERF1* and *LeERF2* overexpression in the response to salinity of young tomato (*Solanum lycopersicum* cv. Micro-Tom) seedlings. *Acta Physiologiae Plantarum* **36**: 1703–1712.

- Huang, C.-K., Sie, Y.-S., Chen, Y.-F., Huang, T.-S., Lu, C.-A.** (2016). Two highly similar DEAD box proteins, OsRH2 and OsRH34, homologous to eukaryotic initiation factor 4AIII, play roles of the exon junction complex in regulating growth and development in rice. *BMC Plant Biology* **16**: 1-15.
- Huang, S., Gao, Y., Liu, J., Peng, X., et al.** (2012). Genome-wide analysis of WRKY transcription factors in *Solanum lycopersicum*. *Molecular Genetics and Genomics* **287**: 495-513.
- Hunt, R.** (1978). Plant Growth Analysis. Edward Arnold, London, pp 12–52. ISBN 0-7131-2696-5.
- Huot, B., Yao, J., Montgomery, B.L., He, S.Y.** (2014). Growth–defense tradeoffs in plants: a balancing act to optimize fitness. *Molecular Plant* **7**: 1267–1287.
- Iovieno, P., Punzo, P., Guida, G., et al.** (2016). Transcriptomic changes drive physiological responses to progressive drought stress and rehydration in tomato. *Frontiers in Plant Science* **7**: 371.
- Ishitani, M., Liu, J., Halfter, U., Kim, C.-S., Shi, W., Zhu, J.-K.** (2000). *SOS3* function in plant salt tolerance requires N-myristoylation and calcium binding. *The Plant Cell* **12**: 1667-1677.
- Ismail, A., Seo, M., Takebayashi, Y., Kamiya, Y., Eiche, E., Nick, P.** (2014). Salt adaptation requires efficient fine-tuning of jasmonate signalling. *Protoplasma* **251**: 881-898.
- Jaime-Pérez, N., Pineda, B., García-Sogo, B., et al.** (2017). The sodium transporter encoded by the *HKT1;2* gene modulates sodium/potassium homeostasis in tomato shoots under salinity. *Plant, Cell and Environment* **40**: 658-671.
- Jenkins, J. A.** (1948). The origin of the cultivated tomato. *Economic Botany* **2**: 379-392.
- Jeon, J.S., Lee, S., Jung, K.H., et al.** (2000). T-DNA insertional mutagenesis for functional genomics in rice. *The Plant Journal* **22**: 561-570.
- Jones, H. G.** (1999). Use of thermography for quantitative studies of spatial and temporal variation of stomatal conductance over leaf surfaces. *Plant, Cell and Environment* **22**: 1043- 1055.
- Joshi, R., Wani, S.H., Singh, B., et al.** (2016). Transcription factors and plants response to drought stress: current understanding and future directions. *Frontiers in Plant Science* **7**: 1029.
- Kanai, M., Hayashi, M., Kondo, M., Nishimura, M.** (2013). The plastidic DEAD-box RNA helicase 22, HS3, is essential for plastid functions both in seed development and in seedling growth. *Plant and Cell Physiology* **54**: 1431-1440.
- Kant, P., Kant, S., Gordon, M., Shaked, R., Barak, S.** (2007). STRESS RESPONSE SUPPRESSOR1 and STRESS RESPONSE SUPPRESSOR2, two DEAD-Box

- RNA helicases that attenuate Arabidopsis responses to multiple abiotic stresses. *Plant Physiology* **145**: 814-830.
- Katschnig, D., Bliet, T., Rozema, J., Schat, H.** (2015). Constitutive high-level *SOS1* expression and absence of *HKT1;1* expression in the salt-accumulating halophyte *Salicornia dolichostachya*. *Plant Science* **234**: 144–154.
- Kazan, K.** (2015). Diverse roles of jasmonates and ethylene in abiotic stress tolerance. *Trends in Plant Science* **20**: 219-229.
- Kidric, M., Kos, J., Sabotic, J.** (2014). Proteases and their endogenous inhibitors in the plant response to abiotic stress. *Botanica Servica* **38**: 139-158.
- Knapp, S., Peralta, I.E.** (2016). The tomato (*Solanum lycopersicum* L., *Solanaceae*) and its botanical relatives. In: Causse M., Giovannoni J., Bouzayen M., Zouine M. (Eds.) The Tomato Genome. Compendium of Plant Genomes. Springer, Berlin, Heidelberg.
- Koenig, D., Jiménez-Gómez, J.M., Kimura, S., et al.** (2014). Comparative transcriptomics reveals patterns of selection in domesticated and wild tomato. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **110**: E2655-E2662.
- Kollist, H., Nukhat, M. Roelfsema, M.R.G.** (2014). Closing gaps: linking elements that control stomatal movement. *New Phytologist* **203**: 44-62.
- Krasensky, J. Jonak, C.** (2012). Drought, salt, and temperature stress-induced metabolic rearrangements and regulatory networks. *Journal of Experimental Botany* **63**: 1593–1608.
- Kuromori, T., Takahashi, S., Kondou, Y., Shinozaki, K., Matsui, M.** (2009). Phenome analysis in plant species using loss-of-function and gain-of-function mutants. *Plant and Cell Physiology* **50**: 1215-1231.
- Ladizinsky, G.** (1985). Founder effect in crop-plant evolution. *Economic Botany* **39**: 191-199.
- Langridge, P., Reynolds, M.P.** (2015). Genomic tools to assist breeding for drought tolerance. *Current Opinion in Biotechnology* **32**: 130-135.
- Larrieu A, Vernoux T.** (2016). Q&A: How does jasmonate signaling enable plants to adapt and survive? *BMC Biology* **14**: 79.
- Le Gall, H., Philippe, F., Domon, J.M., et al.** (2015). Cell wall metabolism in response to abiotic stress. *Plants* **4**: 112-166.
- Leng, Q., Mercier, R.W., Hua, B.-G., Fromm, H., Berkowitz, G.A.** (2002). Electrophysiological analysis of cloned cyclic nucleotide-gated ion channels. *Plant Physiology* **128**: 400-410.
- Li, C., Ng, C.K.-Y., Fan, L.M.** (2015a). MYB transcription factors, active players in abiotic stress signaling. *Environmental and Experimental Botany* **114**: 80–91.

- Li, R., Wang, J., Li, S., et al.** (2016a). Plasma membrane intrinsic proteins *SlPIP2;1*, *SlPIP2;7* and *SlPIP2;5* conferring enhanced drought stress tolerance in tomato. *Scientific Reports* **6**: 31814.
- Li, R., Wang, W., Wang, W., et al.** (2015b). Overexpression of a cysteine proteinase inhibitor gene from *Jatropha curcas* confers enhanced tolerance to salinity stress. *Electronic Journal of Biotechnology* **18**: 368–375.
- Li, X., Wang, Y., Chen, S., et al.** (2018). Lycopene is enriched in tomato fruit by CRISPR/Cas9-mediated multiplex genome editing. *Frontiers in Plant Science*, accepted article, doi: 10.3389/fpls.2018.00559.
- Li, Z., Peng, R., Tian, Y., Han, H., Xu, J., Yao, Q.** (2016b). Genome-wide identification and analysis of the MYB transcription factor superfamily in *Solanum lycopersicum*. *Plant and Cell Physiology* **57**: 1657–1677.
- Liang, Y. K., Xie, X., Lindsay, S. E., et al.** (2010). Cell wall composition contributes to the control of transpiration efficiency in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*, **64**: 679-686.
- Ling, Q., Huang, W., Jarvis, P.** (2011). Use of a SPAD-502 meter to measure leaf chlorophyll concentration in *Arabidopsis thaliana*. *Photosynthesis Research* **107**: 209-214.
- Liu, J., Zhu, J.-K.** (1998). A calcium sensor homolog required for plant salt tolerance. *Science* **280**: 1943-1945.
- Livak, K.J., Schmittgen, T.D.** (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) method. *Methods* **25**: 402-408.
- Lorenzo, O., Piqueras, R., Sánchez-Serrano, J. J., Solano, R.** (2003). ETHYLENE RESPONSE FACTOR1 integrates signals from ethylene and jasmonate pathways in plant defense. *Plant Cell* **15**: 165–178.
- Luan, S.** (2002). Signalling drought in guard cells. *Plant Cell and Environment* **25**: 229–237.
- Luckwill, L.C.** (1943). The genus *Lycopersicon*: an historical, biological, and taxonomical survey of the wild and cultivated tomatoes. *Aberdeen University Studies* **120**: 1– 44.
- Maathuis, F.J.M.** (2014). Sodium in plants: perception, signalling, and regulation of sodium fluxes. *Journal of Experimental Botany* **65**: 849-858.
- Mahajan, S., Pandey, G.K., Tuteja, N.** (2008). Calcium-and salt-stress signaling in plants: shedding light on SOS pathway. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **471**: 146-158.
- Mahajan, S., Tuteja, N.** (2005). Cold, salinity and drought stresses: an overview. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **444**: 139-158.

- Mann, C.C.** (2011). 1493: Uncovering the New World Columbus created. Alfred A. Knopf, New York.
- MAPAMA.** (2016) Ministerio de Agricultura y Pesca, Alimentación y Medio Ambiente. Disponible en: <http://www.mapama.gob.es>.
- Marchadier, E., Hetherington, A.M.** (2014). Involvement of two-component signalling systems in the regulation of stomatal aperture by light in *Arabidopsis thaliana*. *New Phytologist* **203**: 462-468.
- Martel, C., Zhurov, V., Navarro, M., et al.** (2015). Tomato whole genome transcriptional response to *Tetranychus urticae* identifies divergence of spider mite-induced responses between tomato and *Arabidopsis*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **28**: 343–361.
- Martínez-Cordero, M.A., Martínez, V., Rubio, F.** (2004). Cloning and functional characterization of the high-affinity K⁺ transporter *HAK1* of pepper. *Plant Molecular Biology* **56**: 413-421.
- Martínez-Cordero, M.A., Martínez, V., Rubio, F.** (2005). High-affinity K⁺ uptake in pepper plants. *Journal of Experimental Botany* **56**: 1553-1562.
- Martínez-Solano, J., Sánchez-Bel, P., Egea, I., Olmos, E., Hellin, E., Romojaro, F.** (2005). Electron beam ionization induced oxidative enzymatic activities in pepper (*Capsicum annuum* L.), associated with ultrastructure cellular damages. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **53**: 8593–8599.
- Mäser, P., Eckelman, B., Vaidyanathan, R., et al.** (2002). Altered shoot/root Na⁺ distribution and bifurcating salt sensitivity in *Arabidopsis* by genetic disruption of the Na⁺ transporter *AtHKT1*. *FEBS letters* **531**: 157-161.
- Mathews, H., Clendennen, S.K., Caldwell, C.G., et al.** (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., Schmid, M.** (2009). Repression of flowering by the miR172 target SMZ. *PLoS Biology* **7**: 1626.
- Maurel, C., Verdoucq, L., Luu, D.-T., Santoni, V.** (2008). Plant aquaporins: membrane channels with multiple integrated functions. *Annual Review of Plant Biology* **59**: 595-624.
- Maxwell, K., Johnson, G.N.** (2000). Chlorophyll fluorescence—a practical guide. *Journal of Experimental Botany* **51**: 659-668.
- Meldau, S., Ullman-Zeunert, L., Govind, G., Bartram, S., Baldwin, I.T.** (2012). MAPK-dependent JA and SA signalling in *Nicotiana attenuata* affects plant growth and fitness during competition with conspecifics. *BMC Plant Biology* **12**: 213.
- Merlot, S., Mustilli, A. C., Genty, B., et al.** (2002). Use of infrared thermal imaging to isolate *Arabidopsis* mutants defective in stomatal regulation. *The Plant Journal*

30: 601-609.

- Michaeli, S., Fait, A., Lagor, K., et al.** (2011). A mitochondrial GABA permease connects the GABA shunt and the TCA cycle, and is essential for normal carbon metabolism. *The Plant Journal* **67**: 485–498.
- Miller, G., Suzuki, N., Cifti-Yilmaz, S., Mittler R.** (2010). Reactive oxygen species homeostasis and signalling during drought and salinity stresses. *Plant, Cell and Environment* **33**: 453–467.
- Miller, J., Tanksley, S.** (1990). RFLP analysis of phylogenetic relationships and genetic variation in the genus *Lycopersicon*. *Theoretical and Applied Genetics* **80**: 437-448.
- Mingam, A., Toffano-Nioche, C., Brunaud, V., Boudet, N., Kreis, M., Lechamy, A.** (2004). DEAD-box RNA helicases in *Arabidopsis thaliana*: establishing a link between quantitative expression, gene structure and evolution of a family of genes. *Plant Biotechnology Journal* **2**: 401-415.
- Mitra, S., Baldwin, I.T.** (2014). RuBPCase activase (RCA) mediates growth–defense trade-offs: silencing RCA redirects jasmonic acid (JA) flux from JA-isoleucine to methyl jasmonate (MeJA) to attenuate induced defense responses in *Nicotiana attenuata*. *New Phytologist* **201**: 1385–1395.
- Miyao, A., Iwasaki, Y., Kitano, H., et al.** (2007). A large-scale collection of phenotypic data describing an insertional mutant population to facilitate functional analysis of rice genes. *Plant Molecular Biology* **63**: 625–635.
- Mohan Jain, S.** (2001). Tissue culture-derived variation in crop improvement. *Euphytica* **118**: 153-166.
- Møller, I.S., Gilliam, M., Jha, D., et al.** (2009). Shoot Na⁺ exclusion and increased salinity tolerance engineered by cell type-specific alteration of Na⁺ transport in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* **21**: 2163-2178.
- Momayyezi, M., Guy, R.D.** (2017). Substantial role for carbonic anhydrase in latitudinal variation in mesophyll conductance of *Populus trichocarpa* Torr. & Gray. *Plant, Cell and Environment* **40**: 138-149.
- Morillon, R., Liénard, D., Chrispeels, M.J., et al.** (2001). Rapid movements of plants organs require solute-water cotransporters or contractile proteins. *Plant Physiology* **127**: 720–723.
- Moshelion, M., Halperin, O., Wallach, R., Oren, R., Way, D.A.** (2015). Role of aquaporins in determining transpiration and photosynthesis in water-stressed plants: crop water-use efficiency, growth and yield. *Plant Cell and Environment* **38**: 1785–1793.
- Muir, C.D., Hangarter, R.P., Moyle, L.C., Davis, P.A.** (2014). Morphological and anatomical determinants of mesophyll conductance in wild relatives of tomato (*Solanum* sect. *Lycopersicon*, sect. *Lycopersicoides*; Solanaceae). *Plant, Cell and Environment* **37**: 1415–1426.

- Müller, C.H.** (1940). A revision of the genus *Lycopersicon*. *USDA Miscellaneous Publications* **382**: 1–28.
- Müller, N.A., Wijnen, C.L., Srinivasan, A. et al.** (2016). Domestication selected for deceleration of the circadian clock in cultivated tomato. *Nature Genetics* **48**: 89–93.
- Munns, R.** (2002). Comparative physiology of salt and water stress. *Plant, Cell and Environment* **25**: 239-250.
- Munns, R.** (2005). Genes and salt tolerance: bringing them together. *New Phytologist* **167**: 645-663.
- Munns, R.** (2011). Plant adaptations to salt and water stress: differences and commonalities. In: *Plant Responses to Drought and Salinity Stresses: Development in a Post Genomic Era*, Turkan, I. (Ed.). *Advances in Botanical Research* **57**: 1–32.
- Munns, R., Tester, M.** (2008). Mechanisms of salinity tolerance. *Annual Review of Plant Biology* **59**: 651-681.
- Muñoz-Mayor, A., Pineda, B., García-Abellán, J.O., et al.** (2008). The *HAL1* function on Na⁺ homeostasis is maintained over time in salt-treated transgenic tomato plants, but the high reduction of Na⁺ in leaf is not associated with salt tolerance. *Physiologia Plantarum* **133**: 288-297.
- Muñoz-Mayor, A., Pineda, B., García-Abellán, J.O., et al.** (2012). Overexpression of dehydrin *tas14* gene improves the osmotic stress imposed by drought and salinity in tomato. *Journal of Plant Physiology* **169**: 459-468.
- Naciones Unidas.** (2017). World population prospects: the 2017 revision, key findings and advance tables. Disponible en: <https://esa.un.org/unpd/wpp/Publications/>.
- Nakazato, T., Warren, D.L., Moyle, L.C.** (2010). Ecological and geographic modes of species divergence in wild tomatoes. *American Journal of Botany* **97**: 680–693.
- Nawaz, G., Kang, H.** (2017). Chloroplast- or mitochondria-targeted DEAD-Box RNA Helicases play essential roles in organellar RNA metabolism and abiotic stress responses. *Frontiers in Plant Science* **8**: 871.
- Nieves-Cordones, M., Aleman, F., Martinez, V., Rubio, F.** (2010). The *Arabidopsis thaliana* *HAK5* K⁺ transporter is required for plant growth and K⁺ acquisition from low K⁺ solutions under saline conditions. *Molecular Plant* **3**: 326-333.
- Nishimura, K., Ashida, H., Ogawa, T., Yokota, A.** (2010). A DEAD box protein is required for formation of a hidden break in *Arabidopsis* chloroplast 23S rRNA. *The Plant Journal* **63**: 766-777.
- Niu, X., Bressan, R.A., Hasegawa, P.M., Pardo, J.M.** (1995). Ion homeostasis in NaCl stress environments. *Plant Physiology* **109**: 735-742.

- Nuccio, M.L., Rhodes, D., McNeil, S.D., Hanson, A.D.** (1999). Metabolic engineering of plants for osmotic stress resistance. *Current Opinion in Plant Biology* **2**: 128-134.
- O'Malley, R.C., Ecker, J.R.** (2010). Linking genotype to phenotype using the Arabidopsis unimutant collection. *The Plant Journal* **61**: 928-940.
- Ogburn, R.M., Edwards, E.J.** (2010). The ecological water-use strategies of succulent plants. In: *Advances In Botanical Research* 55, Kader, J.C., Delseny, M., (Eds.). London, Elsevier, 180-253.
- Oh, D.H., Leidi, E., Zhang, Q., et al.** (2009). Loss of halophytism by interference with *SOS1* expression. *Plant Physiology* **151**: 210-222.
- Oliás, R., Eljakaoui, Z., Li, J. et al.** (2009). The plasma membrane Na⁺/H⁺ antiporter SOS1 is essential for salt tolerance in tomato and affects the partitioning of Na⁺ between plant organs. *Plant, Cell and Environment* **32**: 904-916.
- Oliver, M.J., Guo, L., Alexander, D.C., Ryals, J.A., Wone, B.W.M., Cushman, J.C.** (2011). A sister group contrast using untargeted global metabolomic analysis delineates the biochemical regulation underlying desiccation tolerance in *Sporobolus stapfianus*. *The Plant Cell* **23**: 1231-1248.
- Olmos, E., Hellín, E.** (1998). Ultrastructural differences of hyperhydric and normal leaves from regenerated carnation plants. *Scientia Horticulturae* **75**: 91-101.
- Onoda, Y., Wright, I.J., Evans, J.R., et al.** (2017). Physiological and structural tradeoffs underlying the leaf economics spectrum. *New Phytologist* **214**: 1447-1463.
- Orsini, F., Accorsi, M., Gianquinto, G., et al.** (2011). Beyond the ionic and osmotic response to salinity in *Chenopodium quinoa*: functional elements of successful halophytism. *Functional Plant Biology* **38**: 818-831.
- Paieri, F., Tadini, L., Manavski, N., et al.** (2018). The DEAD-box RNA helicase RH50 is a 23S-4.5S rRNA maturation factor that functionally overlaps with the plastid signaling factor GUN1. *Plant Physiology* **176**: 634-648.
- Pal, S., Zhao, J., Khan, A. et al.** (2016). Paclobutrazol induces tolerance in tomato to deficit irrigation through diversified effects on plant morphology, physiology and metabolism. *Scientific Reports* **6**: 39321.
- Pang, C.-H., Wang, B.-S.** (2008). Oxidative stress and salt tolerance in plants. In *Progress in botany* (Springer), pp. 231-245.
- Pardo, J.M., Cubero, B., Leidi, E.O., Quintero, F.J.** (2006). Alkali cation exchangers: roles in cellular homeostasis and stress tolerance. *Journal of Experimental Botany* **57**: 1181-1199.
- Park, H.J., Kim, W.-Y., Yun, D.-J.** (2016). A new insight of salt stress signaling in plant. *Molecules and Cells* **39**: 447-459.

- Peralta, I.E., Knapp, S., 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.** (2006). History, origin and early cultivation of tomato (Solanaceae). *Genetic improvement of Solanaceous Crops* **2**: 1-27.
- Pérez-Martín, A., Michelazzo, C., Torres-Ruiz, J.M., et al.** (2014). Regulation of photosynthesis and stomatal and mesophyll conductance under water stress and recovery in olive trees: correlation with gene expression of carbonic anhydrase and aquaporins. *Journal of Experimental Botany* **65**: 3143-3156.
- Pérez-Martín, F., Yuste-Lisbona, F.J., Pineda, B., et al.** (2017). A collection of enhancer trap insertional mutants for functional genomics in tomato. *Plant Biotechnology Journal* **15**: 1439-1452.
- Phukan, U.J., Jeena, G.S., Shukla, R.K.** (2016). WRKY transcription factors: molecular regulation and stress responses in plants. *Frontiers in Plant Science* **7**: 760.
- Phukan, U.J., Jeena, G.S., Tripathi, V., Shukla, R.K.** (2017). Regulation of Apetala 2/Ethylene Response Factors in plants. *Frontiers in Plant Science* **8**: 150.
- Pineda B., García-Abellán, J.O., Antón T., et al.** (2012). Tomato: genomic approaches for salt and drought stress tolerance. In: Improving crop resistance to abiotic stress, Tuteja N., Gill S.S., Tiburcio A.F., Tuteja R (Eds). Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, pp. 1083-1118.
- Plasencia-Martínez, F.** (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 Ca^{2+} en tomate. Tesis Doctoral, Universidad de Murcia.
- Platten, J.D., Cotsaftis, O., Berthomieu, P., et al.** (2006). Nomenclature for *HKT* transporters, key determinants of plant salinity tolerance. *Trends in Plant Science* **11**: 372-374.
- Pogson, B.J., Woo, N.S., Foerster, B., Small, I.D.** (2008). Plastid signalling to the nucleus and beyond. *Trends in Plant Science* **13**: 602–609.
- Poole, R.J.** (1978). Energy coupling for membrane transport. *Annual Review of Plant Physiology* **29**: 437–460.
- Prohens, J., Nuez, F., Carena, M.J.** (2008). Handbook of plant breeding. Springer.
- Qi, Z., Spalding, E.P.** (2004). Protection of plasma membrane K^+ transport by the salt overly sensitive1 $\text{Na}^+\text{-H}^+$ antiporter during salinity stress. *Plant Physiology* **136**: 2548-2555.
- Qian, Z.-J., Song, J.-J., Chaumont, F., Ye, Q.** (2015). Differential responses of plasma membrane aquaporins in mediating water transport of cucumber

- seedlings under osmotic and salt stresses. *Plant, Cell and Environment* **38**: 461-473.
- Qiu, Q.-S., Guo, Y., Dietrich, M.A., Schumaker, K.S., Zhu, J.-K.** (2002). Regulation of *SOS1*, a plasma membrane Na^+/H^+ 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., Zhu, J.-K.** (2004). Regulation of vacuolar Na^+/H^+ exchange in *Arabidopsis thaliana* by the salt-overly-sensitive (SOS) pathway. *Journal of Biological Chemistry* **279**: 207-215.
- Quintero, F.J., Ohta, M., Shi, H., Zhu, J.-K., Pardo, J.M.** (2002). Reconstitution in yeast of the *Arabidopsis* SOS signaling pathway for Na^+ homeostasis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **99**: 9061-9066.
- Rabara, R.C., Tripathi, P., Reese, R.N. et al.** (2015). Tobacco drought stress responses reveal new targets for Solanaceae crop improvement. *BMC Genomics* **16**: 484.
- Redondo-Gómez, S., Mateos-Naranjo, E., Figueroa, M.E., Davy, A.J.** (2010). Salt stimulation of growth and photosynthesis in an extreme halophyte, *Arthrocnemum macrostachyum*. *Plant Biology* **12**: 79-87.
- Ren, Z.-H., Gao, J.-P., Li, L.-G., et al.** (2005). A rice quantitative trait locus for salt tolerance encodes a sodium transporter. *Nature Genetics* **37**: 1141-1146.
- Reuscher, S., Akiyama, M., Mori, C., Aoki, K., Shibata, D., Shiratake, K.** (2013). Genome-wide identification and expression analysis of aquaporins in tomato. *Plos One* **8**: e79052.
- Reyes, J.L., Rodrigo, M.-J., Colmenero-Flores, J.M., et al.** (2005). Hydrophilins from distant organisms can protect enzymatic activities from water limitation effects *in vitro*. *Plant, Cell and Environment* **28**: 709-718.
- Rhodes, D., Hanson, A.** (1993). Quaternary ammonium and tertiary sulfonium compounds in higher plants. *Annual Review of Plant Biology* **44**: 357-384.
- Rick, C.** (1973). Potential genetic resources in tomato species: clues from observations in native habitats. In: Genes, enzymes, and populations, Srb, A.M. (Ed.), Basic Life Sciences, 2. Springer, Boston, pp. 255-269.
- Ritchie, M.E., Phipson B., Wu D., et al.** (2015). *limma* powers differential expression analyses for RNA-sequencing and microarray studies. *Nucleic Acids Research* **43**: e47.
- Robredo, A., Pérez-López, U., Miranda-Apodaca, J., Lacuesta, M., Mena-Petite, A., Muñoz-Rueda, A.** (2011). Elevated CO_2 reduces the drought effect on nitrogen metabolism in barley plants during drought and subsequent recovery. *Environmental and Experimental Botany* **71**: 399-408.

- Rocak, S., Linder, P.** (2004). DEAD-box proteins: the driving forces behind RNA metabolism. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **5**: 232-241.
- Rodriguez-Rosales, M.P., Galvez, F.J., Huertas, R., et al.** (2009). Plant NHX cation/proton antiporters. *Plant Signaling and Behavior* **4**: 265-276.
- Rodriguez-Rosales, M.P., Jiang, X., Galvez, F.J., Aranda, M.N., Cubero, B., Venema, K.** (2008). Overexpression of the tomato K^+/H^+ antiporter *LeNHX2* confers salt tolerance by improving potassium compartmentalization. *New Phytologist* **179**: 366-377.
- Rubio, F., Santa-María, G.E., 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., Aleman, F., Nieves-Cordones, M., 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. *Physiologia Plantarum* **139**: 220-228.
- Rus, A.M., Panoff, M., Pérez-Alfocea, F., Bolarín, M.C.** (1999). NaCl responses in tomato calli and whole plants. *Journal of Plant Physiology* **155**: 727-733.
- Rus, A., Yokoi, S., Sharkhuu, A., et al.** (2001). *AtHKT1* is a salt tolerance determinant that controls Na^+ entry into plant roots. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **98**: 14150-14155.
- Rus, A., Lee, B.-H., Muñoz-Mayor, A., et al.** (2004). *AtHKT1* facilitates Na^+ homeostasis and K^+ nutrition in planta. *Plant Physiology* **136**: 2500-2511.
- 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.
- Sade, N., Vincour, B.J., Diber, A., et al.** (2009). Improving plant stress tolerance and yield production: is the tonoplast aquaporin *SITIP2;2* a key to isohydric to anisohydric conversion? *New Phytologist* **181**: 651-661.
- Saibo, N. J., Lourenço, T., Oliveira, M.M.** (2009). Transcription factors and regulation of photosynthetic and related metabolism under environmental stresses. *Annals of Botany* **103**: 609-623.
- Sánchez-Bel, P., Egea, I., Sánchez-Ballesta, M.T., et al.** (2012). Understanding the mechanisms of chilling injury in bell pepper fruits using the proteomic approach. *Journal of Proteomics* **75**: 5463-5478.
- Santa-Cruz, A., Acosta, M., Rus, A., Bolarín, M.C.** (1999). Short-term salt tolerance mechanisms in differentially salt tolerant tomato species. *Plant Physiology and Biochemistry* **37**: 65-71.
- Santa-Maria, G.E., Rubio, F., Dubcovsky, J., 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.
- Sayed, O.H.** (2003). Chlorophyll fluorescence as a tool in cereal crop research. *Photosynthetica* **41**: 321-330.
- Schaart, J.G., van de Wiel, C.C., Lotz, L.A., Smulders, M.J.** (2016). Opportunities for products of new plant breeding techniques. *Trends in Plant Science* **21**: 438–449.
- Schneeberger, K., Hagemann, J., Ossowski, S., et al.** (2009). Simultaneous alignment of short reads against multiple genomes. *Genome Biology* **10**: R98.
- Schwarz, D., Thompson, A.J. Kläring, H.-P.** (2014). Guidelines to use tomato in experiments with a controlled environment. *Frontiers in Plant Science* **5**: 625.
- Smirnoff, N.** (1993). The role of active oxygen in the response of plants to water deficit and desiccation. *New Phytologist* **125**: 27-58.
- Seo, P.J., Mas, P.** (2015). STRESSing the role of the plant circadian clock. *Trends in Plant Science* **20**: 230-237.
- Serrano, R., Culiáñez-Maciá, F.A., Moreno, V.** (1998). Genetic engineering of salt and drought tolerance with yeast regulatory genes. *Scientia Horticulturae* **78**: 261-269.
- Serrano, R., Mulet, J.M., Ríos, G., et al.** (1999). A glimpse of the mechanisms of ion homeostasis during salt stress. *Journal of Experimental Botany* **50**: 1023-1036.
- Shabala, L., Mackay, A., Tian, Y., Jacobsen, S.E., Zhou, D., Shabala, S.** (2012). Oxidative stress protection and stomatal patterning as components of salinity tolerance mechanism in quinoa (*Chenopodium quinoa*). *Physiologia Plantarum* **146**: 26–38.
- Shabala, S., Cuin, T.A.** (2008). Potassium transport and plant salt tolerance. *Physiologia Plantarum* **133**: 651-669.
- Shabala, S., Mackay, A.** (2011). Ion transport in halophytes. *Advances in Botanical Research* **57**: 151-187.
- Shabala, S.** (2013). Learning from halophytes: physiological basis and strategies to improve abiotic stress tolerance in crops. *Annals of Botany* **112**: 1209-1221.
- Shabala, S., Hariadi, Y., Jacobsen, S.-E.** (2013). Genotypic difference in salinity tolerance in quinoa is determined by differential control of xylem Na⁺ loading and stomatal density. *Journal of Plant Physiology* **170**: 906-914.
- Shabala, S., Bose, J., Hedrich, R.** (2014). Salt bladders: do they matter? *Trends in Plant Science* **19**: 687-691.
- Shabala, S., Pottosin, I.** (2014). Regulation of potassium transport in plants under hostile conditions: implications for abiotic and biotic stress tolerance. *Physiologia Plantarum* **151**: 257-279.

- Shanker, A.K., Djanaguiraman, M., Sudhagar, R., Chandrashekar, C., 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.
- 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., Zhu, J.-K.** (2000). The *Arabidopsis thaliana* salt tolerance gene *SOS1* encodes a putative Na⁺/H⁺ antiporter. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **97**: 6896-6901.
- Shi, H., Quintero, F.J., Pardo, J.M., Zhu, J.-K.** (2002). The putative plasma membrane Na⁺/H⁺ antiporter *SOS1* controls long-distance Na⁺ transport in plants. *The Plant Cell* **14**: 465-477.
- Shoji, T., Suzuki, K., Abe, T., et al.** (2006). Salt stress affects cortical microtubule organization and helical growth in *Arabidopsis*. *Plant and Cell Physiology* **47**: 1158-1168.
- Sirault, X.R., James, R.A., Furbank, R.T.** (2009). A new screening method for osmotic component of salinity tolerance in cereals using infrared thermography. *Functional Plant Biology* **36**: 970-977.
- Skirycz, A., De Bodt, S., Obata, T., et al.** (2010). Developmental stage specificity and the role of mitochondrial metabolism in the response of *Arabidopsis* leaves to prolonged mild osmotic stress. *Plant Physiology* **152**: 226-244.
- Slama, I., Abdelly, C., Bouchereau, A., Flowers, T., Savouré, A.** (2015). Diversity, distribution and roles of osmoprotective compounds accumulated in halophytes under abiotic stress. *Annals of Botany* **115**: 433-447.
- Slovak, R., Ogura, T., Satbhai, S. B., Ristova, D. Busch, W.** (2016). Genetic control of root growth: from genes to networks. *Annals of Botany* **117**: 9-24.
- Solanaceae Genome Network (SGN).** URL: <https://solgenomics.net>.
- Spurr, A.R.** (1969). A low-viscosity epoxy resin embedding medium for electron microscopy. *Journal of Ultrastructure Research* **26**: 31-43.
- Sun, A.-Z., Guo, F.-Q.** (2016). Chloroplast retrograde regulation of heat stress responses in plants. *Frontiers in Plant Science* **7**: 398.
- Sun, X., Wang, F., Cai, H., Zhao, C.H., Ji, W., Zhu, Y.** (2013). Functional characterization of an *Arabidopsis* prolyl aminopeptidase AtPAP1 in response to salt and drought stresses. *Plant Cell Tissue Organ Culture* **114**: 325-338.
- Sunarpi, Horie, T., Motoda, J., et al.** (2005). Enhanced salt tolerance mediated by *AtHKT1* transporter-induced Na⁺ unloading from xylem vessels to xylem parenchyma cells. *The Plant Journal* **44**: 928-938.

- Taiz, L., Zeiger, E.** (2007). Fisiología vegetal. Universidad Jaume I. Castellón de la Plana. ISBN 978-84-8021-601-2.
- Taniguchi, M., Miyake, H.** (2012). Redox-shuttling between chloroplast and cytosol: integration of intra-chloroplast and extra-chloroplast metabolism. *Current Opinion in Plant Biology* **15**: 252-260.
- Taylor, I.** (1986). Biosystematics of the tomato. In: The tomato crop, Atherton, J.G., Rudich, J. (Eds.), Springer, pp. 1-34.
- Tester, M., Davenport, R.** (2003). Na⁺ tolerance and Na⁺ transport in higher plants. *Annals of Botany* **91**: 503-527.
- Tester, M., Langridge, P.** (2010). Breeding technologies to increase crop production in a changing world. *Science* **327**: 818–822.
- The Tomato Genome Consortium.** (2012). The tomato genome sequence provides insights into fleshy fruit evolution. *Nature* **485**: 635-641.
- Thimm, O., Bläsing, O., Gibon, Y. et al.** (2004). Mapman: a user-driven tool to display genomics data sets onto diagrams of metabolic pathways and other biological processes. *The Plant Journal* **37**: 914–939.
- Tuteja, N.** (2007). Chapter Twenty-Four-Mechanisms of High Salinity Tolerance in Plants. *Methods in Enzymology* **428**: 419-438.
- Tuteja, N., Sahoo, R.K., Garg, B., Tuteja, R.** (2013). OsSUV3 dual helicase functions in salinity stress tolerance by maintaining photosynthesis and antioxidant machinery in rice (*Oryza sativa* L. cv. IR64). *The Plant Journal* **76**: 115-127.
- Tytgat, T.O.G., Verhoeven, K.J.F., Jansen, J.J., et al.** (2013). Plants know where it hurts: root and shoot jasmonic acid induction elicit differential responses in *Brassica oleracea*. *PLoS One* **8**: e65502.
- Uddin MN, Hossain MA, Burrit DJ.** (2016). Salinity and drought stress: similarities and differences in oxidative responses and cellular redox regulation. In: Water stress and crop plants: a sustainable approach, Ahmad, P. (Ed.), Wiley & Sons, Ltd., pp 86-101.
- Ueta, R., Abe, C., Watanabe, T., et al.** (2017). Rapid breeding of parthenocarpic tomato plants using CRISPR/Cas9. *Scientific Reports* **7**: 507.
- Vanlerberghe, G.C.** (2013). Alternative oxidase: a mitochondrial respiratory pathway to maintain metabolic and signaling homeostasis during abiotic and biotic stress in plants. *International Journal of Molecular Sciences* **14**: 6805-6847.
- Vanlerberghe, G.C., Martyn, G.D., Dahal, K.** (2016). Alternative oxidase: a respiratory electron transport chain pathway essential for maintaining photosynthetic performance during drought stress. *Physiologia Plantarum* **157**: 322–337.

- Venema, K., Belver, A., Marín-Manzano, M.C., Rodríguez-Rosales, M.P., y Donaire, J.P.** (2003). A novel intracellular K^+/H^+ antiporter related to Na^+/H^+ antiporters is important for K^+ ion homeostasis in plants. *Journal of Biological Chemistry* **278**: 22453-22459.
- Verslues, P.E., Agarwal, M., Katiyar-Agarwal, S., Zhu, J., Zhu, J-K.** (2006). Methods and concepts in quantifying resistance to drought, salt and freezing, abiotic stresses that affect plant water status. *The Plant Journal* **45**: 523-539.
- Véry, A.-A., Sentenac, H.** (2003). Molecular mechanisms and regulation of K^+ transport in higher plants. *Annual Review of Plant Biology* **54**: 575–603.
- Vishwakarma, A., Tetali, S.D., Selinski, J., Scheibe, R., Padmasree, K.** (2015). Importance of the alternative oxidase (AOX) pathway in regulating cellular redox and ROS homeostasis to optimize photosynthesis during restriction of the cytochrome oxidase pathway in *Arabidopsis thaliana*. *Annals of Botany* **116**: 555–569.
- Voytas, D.F., Gao, C.** (2014). Precision genome engineering and agriculture: opportunities and regulatory challenges. *PLoS Biology* **12**: e1001877.
- Wakeel, A., Farooq, M., Qadir, M., Schubert, S.** (2011). Potassium substitution by sodium in plants. *Critical Reviews in Plant Sciences* **30**: 401–413.
- Wang, Q.-M., Wang, L.** (2012). An evolutionary view of plant tissue culture: somaclonal variation and selection. *Plant Cell Reports* **31**: 1535-1547.
- Wang, Y., Holroyd, G., Hetherington, A.M., Ng, C.K.Y.** (2004). Seeing ‘cool’ and ‘hot’—infrared thermography as a tool for non-invasive, high-throughput screening of *Arabidopsis* guard cell signalling mutants. *Journal of Experimental Botany* **55**: 1187-1193.
- Wasternack, C.** (2014). Action of jasmonates in plant stress responses and development—applied aspects. *Biotechnology Advances* **32**: 31-39.
- Wasternack, C., Hause, B.** (2013). Jasmonates: biosynthesis, perception, signal transduction and action in plant stress response, growth and development. *Annals of Botany* **111**: 1021-58.
- Wegner, L.** (2014). Root pressure and beyond: energetically uphill water transport into xylem vessels? *Journal of Experimental Botany* **65**: 381–393.
- Wegner, L.** (2017). Cotransport of water and solutes in plant membranes: The molecular basis, and physiological functions. *AIMS Biophysics* **4**: 192-209.
- Wesley, S.V., Helliwell, C.A., Smith, N.A., et al.** (2001). Construct design for efficient, effective and high-throughput gene silencing in plants. *The Plant Journal* **27**: 581–590.
- Williams, L.E., Lemoine, R., Sauer, N.** (2000). Sugar transporters in higher plants—a diversity of roles and complex regulation. *Trends in Plant Science* **5**: 283–290.

- Wilson-Sánchez, D., Rubio-Díaz, S., Muñoz-Viana, R., et al.** (2014). Leaf phenomics: a systematic reverse genetic screen for *Arabidopsis* leaf mutants. *The Plant Journal* **79**: 878-891.
- Winicov, I.** (1998). New molecular approaches to improving salt tolerance in crop plants. *Annals of Botany* **82**: 703-710.
- Woodson, J.D.** (2016). Chloroplast quality control – balancing energy production and stress. *New Phytologist* **212**: 36-41.
- Wu, S.-J., Ding, L., Zhu, J.-K.** (1996). *SOS1*, a genetic locus essential for salt tolerance and potassium acquisition. *The Plant Cell* **8**: 617-627.
- Xia, X.-J., Zhou, Y.-H., Shi, K., Zhou, J., Foyer, C.H., Yu, J.-Q.** (2015). Interplay between reactive oxygen species and hormones in the control of plant development and stress tolerance. *Journal of Experimental Botany* **66**: 2839–2856.
- Xin, S., Yu, G., Sun, L., Qiang, X., Xu, N., Cheng, X.** (2014). Expression of tomato *SITIP2;2* enhances the tolerance to salt stress in the transgenic *Arabidopsis* and interacts with target proteins. *Journal of Plant Research* **127**: 695–708.
- Xiong, L., Schumaker, K.S., Zhu, J.-K.** (2002). Cell signaling during cold, drought, and salt stress. *Plant Cell* **14**: S165-183.
- Xiong, L., Zhu, J.-K.** (2002). Molecular and genetic aspects of plant responses to osmotic stress. *Plant, Cell and Environment* **25**: 131-139.
- Xu, R., Zhang, S., Lu, L., Cao, H., Zheng, C.** (2013a). A genome-wide analysis of the RNA helicase gene family in *Solanum lycopersicum*. *Gene* **513**: 128-140.
- Xu, R., Zhang, S., Huang, J., Zheng, C.** (2013b). Genome-wide comparative *in silico* analysis of the RNA helicase gene family in *Zea mays* and *Glycine max*: a comparison with *Arabidopsis* and *Oryza sativa*. *PLoS One* **8**: e78982.
- Yamaguchi, M., Sharp, R.E.** (2010). Complexity and coordination of root growth at low water potentials: recent advances from transcriptomic and proteomic analyses. *Plant, Cell and Environment* **33**: 590–603.
- Yang, D.-L., Yao, J., Mei, C.-S., et al.** (2012). Plant hormone jasmonate prioritizes defense over growth by interfering with gibberellin signaling cascade. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **109**: E1192–E1200.
- Yao, X., Horie, T., Xue, S., et al.** (2010). Differential sodium and potassium transport selectivities of the rice *OsHKT2;1* and *OsHKT2;2* transporters in plant cells. *Plant Physiology* **152**: 341-355.
- Yeo, A.** (2007). Salinity. *Plant solute transport*: 340-370.
- Yi, G., Luth, D., Goodman, T.D., Lawrence, C.J., Becraft, P.W.** (2009). High-throughput linkage analysis of Mutator insertion sites in maize. *The Plant Journal* **58**: 883-892.

- Yu, S., Wang, W., Wang, B.** (2012). Recent progress of salinity tolerance research in plants. *Russian Journal of Genetics* **48**: 497-505.
- Zaghoud, C., Carvajal, M., Ferchichi, A., Martinez-Ballesta, M. D.** (2016). Water balance and N-metabolism in broccoli (*Brassica oleracea* L. var. Italica) plants depending on nitrogen source under salt stress and elevated CO₂. *Science of the Total Environment* **571**: 763-771.
- Zhang, G.-B., Yi, H.-Y., Gong, J.-M.** (2014). The Arabidopsis ethylene/jasmonic acid-NRT signaling module coordinates nitrate reallocation and the trade-off between growth and environmental adaptation. *The Plant Cell* **26**: 3984–3998.
- Zhang, J., Klueva, N.Y., Wang, Z., Wu R., Ho T-H. D., Nguyen H.T.** (2000). Genetic engineering for abiotic stress resistance in crop plants. *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant* **36**: 108–114.
- Zhang, L.-T., Zhang, Z.-S., Gao, H.-Y., et al.** (2012). The mitochondrial alternative oxidase pathway protects the photosynthetic apparatus against photodamage in *Rumex* K-1 leaves. *BMC Plant Biology* **12**: 40.
- 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**: 247-273.
- Zhu, J.-K.** (2016). Abiotic stress signaling and responses in plants. *Cell* **167**: 313–324.
- Zhu, J.K., Liu, J., 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, M., Chen, G., Dong, T., et al.** (2015). *SIDEAD31*, a putative DEAD-Box RNA Helicase gene, regulates salt and drought tolerance and stress-related genes in tomato. *PLoS One* **10**: e0133849.
- Zhu, T., Deng, X., Zhou, X., et al.** (2016). Ethylene and hydrogen peroxide are involved in brassinosteroid-induced salt tolerance in tomato. *Scientific Reports* **6**: 35392.

ANEXOS

Anexo I. Lista de transcritos con diferencias de expresión significativas entre *S. pennellii* y *S. lycopersicum* en control y estrés hídrico, así como los diferencialmente expresados entre condiciones en *S. pennellii*.

#	ID sonda ¹	Código Bin ²	ID gen ³	Anotación/Descripción ⁴	Abreviatura
Producción de acetil-CoA y biosíntesis de isoprenoides					
1	lesaffx.1956.1.s1_at	5.10	823955	aldehyde dehydrogenase 2B4	ALDH 2B4
2	les.2817.2.s1_at	8.2.11	842375	ATP-citrate lyase A-2	ACLA-2
3	les.2160.1.a1_at	11.1.20	825752	malonyl-CoA decarboxylase	MCD
4	les.4390.1.a1_at	16.1.2.2	826788	hydroxymethylglutaryl-CoA synthase	HMGS (MVA1)
5	Les.4457.1.s1_s_at	16.1.5	832461	Terpene synthase 21	TPS21
Biosíntesis de carotenoides					
6	les.4438.1.a1_s_at	16.1.4.1	831587	phytoene synthase	PSY
7	les.2287.3.a1_at	29.6	830500	ORANGE-like protein	OR-L
Biosíntesis y transporte de mio-inositol					
8	les.2012.1.s1_at	3.4.3	830881	myo-inositol-1-phosphate synthase 3	MIPS3
9	les.3756.1.s1_a_at	34.2	818934	tonoplast myo-inositol exporter (H+/myo-inositol symporter)	INT1
Fotorrespiración					
10	les.2102.1.a1_at	1.2.2	820630	glycolate oxidase	GOX
11	les.1979.1.a1_at	7.1.3	838342	glyoxylate reductase 2	GLYR2
Homeostasis redox					
12	lesaffx.3918.1.s1_at	21.2.1	820121	cytosolic ascorbate peroxidase 2	APX2
13	lesaffx.51366.1.s1_at	11.8	835538	flavodoxin-like quinone reductase 1	FQR1
14	lesaffx.32653.1.s1_at	21.2.2	824631	glutathione reductase 2	GR2
15	les.167.1.s1_at	21.6	817365	chloroplastic Cu/Zn superoxide dismutase 2	CSD2
Metabolismo de lípidos					
16	les.745.1.a1_at	11.1.9	819337	long-chain acyl-coenzyme A synthase 1	LACS1
17	les.2095.1.a1_at	11.2.4	820387	ω -6-fatty acid desaturase 2	FAD2
Proteínas relacionadas con la patogénesis y la respuesta a estrés					
18	les.3673.1.s1_at	26.4	824893	β 1,3-glucanase 2	BGL2
19	les.3583.1.a1_at	20.2.99	843890	salt tolerance homolog 2 transcription factor	STH2
20	lesaffx.823.1.s1_at	20.1	829514	putative pathogenesis-related protein	putative PR
21	les.1842.1.s1_at	20.1	840294	avirulence induced gene protein	AIG
22	les.5711.1.s1_at	29.5.3	830064	responsive to dehydration 19A transcription factor	RD19A
Factores de elongación					
23	les.419.2.s1_at	29.2.4	836161	GTP-binding Elongation Factor Tu	EF-Tu
24	les.5230.1.s1_at	29.2.4	837491	elongation Factor 1B gamma	EF-1Bg
Regulación del movimiento estomático					
25	les.796.1.a1_at	8.3	821134	carbonic anhydrase 1	CA1

Metabolismo de la pared celular					
26	les.4530.1.s1_at	10.7	821955	xyloglucan:xyloglucosyl transferase xyloglucan endotransglucosylase/ hydrolase 9	XTH9
27	lesaffx.5130.1.s1_at	10.7	842879	expansin B2	EXPB2
28	lesaffx.32379.1.s1_at	26.2	838512	PARVUS Nucleotide-diphospho- sugar transferases superfamily protein (xylan biosynthesis, galacturonosyltransferase activity)	PARVUS/GLZ1
Metabolismo primario de carbohidratos					
29	les.1617.1.s1_s_at	2.1.1.3	840953	cytosolic fructose-1,6- biphosphatase / FRUCTOSE INSENSITIVE 1	cFBP/FINS1
30	lesaffx.29037.1.s1_at	2.1.2.1	834883	ADP-glucose pyrophosphorylase 1	ADG1
Asimilación de nitrógeno					
31	les.2360.1.s1_at	12.1.2	816055	ferredoxin-nitrite reductase 1	NIR1
32	les.4317.1.s1_at	13.1.3.1	823888	glutamine-dependent asparagine synthase 1	ASN1
33	lesaffx.67643.1.s1_at	13.2.3.1	820860	asparaginase 2	Asparaginase 2
34	les.899.1.s1_at	30.1	835427	NADH-dependent glutamate synthase 1 / Glutamine- oxoglutarate aminotransferase	GLT1 (GOGAT)
Glutamato deshidrogenasa y GABA-shunt					
35	les.4851.1.s1_at	12.3.1	830635	glutamate dehydrogenase 2	GDH2
36	les.249.1.s1_at	13.1.1.1.1	831599	glutamate decarboxylase 1	GAD1
37	les.3289.1.s1_at	13.1.1.3	821784	gamma-aminobutyrate transaminase / POLLEN-PISTIL INCOMPATIBILITY 2	GABA-T (POP2)
Transporte de aminoácidos					
38	les.4075.1.s1_at	34.3	844074	amino acid permease 3	AAP3
Metabolismo de BCAAs					
39	lesaffx.70406.1.s1_at	13.1.4.1.4	836707	branched-chain-amino-acid transaminase 5	BCAT5
40	lesaffx.69324.2.s1_at	13.2.6.3	836724	3-hydroxyisobutyryl-CoA hydrolase 1	CHY1
Biosíntesis de ABA					
41	les.3529.1.s1_at	34.99	817257	aldehyde oxidase 3	AAO3
42	les.3454.1.s1_at	18	838224	molybdenum cofactor sulfurase ABA3 (LOSS)	ABA3 (MCSU)
Biosíntesis de JA					
43	les.3632.1.s1_at	17.7.1.2	838314	lipoxygenase 3 (13-lipoxygenase)	LOX3
44	les.13.1.s1_at	17.7.1.3	834273	allene oxide synthase	AOS
45	lesaffx.38775.1.s1_at	17.7.1.5	844001	cis-(+)-12-oxo-phytodienoic acid reductase 2	OPR2
46	les.612.1.s1_at	17.8.1	838551	jasmonic acid carboxyl methyltransferase	JMT
Biosíntesis y señalización de ET					
47	les.5917.1.s1_at	17.5.1	816478	1-aminocyclopropane-1- carboxylate oxidase 1	ACO1
48	les.132.1.s1_at	17.5.1	839345	1-aminocyclopropane-1- carboxylate oxidase 4	ACO4

49	les.3818.1.s1_at	17.5.2	821902	ethylene-responsive element binding factor 1B	ERF1B
50	lesaffx.3059.1.s1_at	17.5.2	821900	ethylene-responsive element binding factor 095	ERF095

¹ Código de las sondas del microarray GeneChip® Tomato Genome

² Códigos de las categorías funcionales (bins) de Mapman (<http://mapman.gabipd.org>)

³ Código del gen de acuerdo a la base de datos NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene>)

⁴ Descripción/anotación funcional de cada transcrito de acuerdo al programa Mapman