

## ANEXO I

### PROTOCOLOS

Debido a la imposibilidad de acceso a los laboratorios del Instituto Universitario de Conservación y Mejora de la Agrodiversidad Valenciana (COMAV) durante el estado de alarma para la gestión de la situación de crisis sanitaria ocasionada por la COVID-19, no se pudieron realizar los experimentos con estrés salino planteados con las plantas del cuarto experimento, ni tampoco se pudieron llevar a cabo los experimentos que involucraban determinaciones bioquímicas y moleculares, como se explica en este trabajo. Sin embargo, como también se detalla, estos experimentos sí que fueron planteados y preparados, y las muestras se encuentran recogidas y conservadas para su análisis en el momento que la crisis sanitaria lo permita. Estos protocolos planteados se describen a continuación.

- **Daño oxidativo a lípidos**

Se extrajeron los peróxidos de lípidos machacando 0.5 g de las muestras recogidas anteriormente en un mortero sobre hielo, y se añadió 6 mL de tampón fosfato potásico 100 mM (pH = 7). A continuación, se realizó la filtración de los homogeneizados utilizando un filtro Miracloth, y centrifugándolo a 15.000 x g durante 20 minutos. Después, para la formación del cromógeno, se añadieron en un tubo limpio 200 mL del sobrenadante obtenido junto con 1 mL de una mezcla de reacción previamente preparada, que contenía ácido tricloroacético al 15% (p/v), ácido 2-triobarbitúrico al 0.375 (p/v), butilhidroxitolueno al 0.1% (p/v) y ácido clorhídrico (HCl) 0.25 N, y se incubó la mezcla a 100 °C durante 30 minutos. Una vez enfriada, la mezcla se volvió a centrifugar a 800 x g durante 5 minutos, y se cuantificó el sobrenadante en un espectrofotómetro *Peak E-1000UV* (Peak, Houston, Texas, EE. UU.), a una longitud de onda de 532 nm.

*Para cuantificar la peroxidación de lípidos expresada en equivalentes de malondialdehído (MDA)* (Halliwell y Gutteridge, 1985), se preparó una curva de calibración utilizando MDA en el rango de concentraciones 0.1-10 µM, utilizando en cada caso un volumen final de 1 mL. Además, se utilizó un blanco que contenía únicamente tampón de extracción (tampón fosfato potásico), y como controles para cada muestra, el proceso de preparación fue análogo, pero reemplazando en la mezcla de reacción el TBA por HCl 0.25 N.

- **Peróxido de hidrógeno**

Para esta determinación, se utilizaron 0.5 g de las muestras recogidas y se homogeneizaron en un mortero sumergido en hielo junto con 5 mL de ácido tricloroacético al 5% (p/v) que contenía 0.1 g de carbón activado y polivinilpolipirrolidona (PVPP) al 1% (p/v).

El homogeneizado obtenido se centrifugó a 18.000 g durante 10 minutos, y el sobrenadante recuperado se filtró utilizando un filtro Millipore de 0,22 µm. Después, se seleccionaron 130 mL del filtrado y se le añadió un volumen de 1.2 mL de tampón fosfato potásico 100 mM (pH = 8,4) y 0.6 mL de reactivo colorimétrico. Este reactivo se preparó realizando una mezcla 1:1 (v/v) de oxalato de titanio y potasio 0.6 mM y 4-(2-piridilazo) resorcinol 0.6 mM. Las muestras se incubaron a 45 °C durante 1 hora y se midió la absorbancia a 508 nm en el mismo espectrofotómetro que en el caso anterior. Además, los blancos se realizaron utilizando el mismo procedimiento pero reemplazando el homogeneizado obtenido a partir de las muestras por ácido tricloroacético al 5%.

- **Prolina y azúcares totales**

Para la extracción de la prolina y los azúcares totales, se homogeneizó la muestra con 3 mL de metanol durante 1 minuto en el vórtex, repitiendo el proceso una vez más. Después, se añadió 6 mL de cloroformo y se homogeneizó de forma análoga. Por último, se añadió 3 mL de NaCl al 0.9 % (p/v)

y se centrifugó a  $4\ 340 \times g$  durante 10 minutos en una centrífuga refrigerada Eppendorf 5804 R (Eppendorf, Hamburgo, Alemania), a  $1\ ^\circ\text{C}$ . Con la fase metanólica (superior) del proceso anterior, se cuantificó tanto la prolina como los azúcares totales.

La reacción de la ninhidrina utilizada para cuantificar el contenido en prolina fue preparada haciendo reaccionar 1 mL de la fase metanólica con 1 mL de reactivo de ninhidrina y 1 mL de ácido acético glacial. Después se llevó esta mezcla a ebullición durante 1 hora y se paró la reacción sumergiendo los tubos en hielo. Por último, se extrajo la prolina con 2 mL de tolueno agitando en vórtex, y se midió espectrofotométricamente a 515 nm utilizando tolueno como blanco. Además, se realizó una curva patrón con concentraciones de prolina 0, 25, 50, 100, 200 y 300  $\mu\text{M}$  a partir de una solución de prolina 1 mM.

En el caso de la cuantificación de los azúcares solubles, el proceso comenzó haciendo reaccionar 0.025 mL de la fase metanólica previamente recuperada con 3 mL de reactivo de antrona, preparado mezclando 200 mg de antrona con 100 mL de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  al 72% (v/v), y sumergiéndolo en agua hirviendo durante 10 minutos. Después de su enfriado, se midió la absorbancia a 620 nm en el espectrofotómetro mencionado anteriormente utilizando agua como blanco, y elaborando una curva patrón con glucosa en el rango de concentraciones 0.2-0.4 mg/mL.

- **PCR cuantitativa con transcripción reversa (RT-PCRq)**

Cada reacción de RT-PCRq consistió en un volumen de 23  $\mu\text{L}$  que contenía 3  $\mu\text{L}$  de una dilución 1:10 (v/v) de ADNc en agua, 10  $\mu\text{L}$  de reactivo Green Master Mix (NZYTech, Lisboa, Portugal), 6.4  $\mu\text{L}$  de agua desionizada, y 0.8  $\mu\text{L}$  de cada par de cebadores a una concentración de 10  $\mu\text{M}$ .

El programa de PCR que se utilizó fue una primera incubación de 5 minutos a  $95\ ^\circ\text{C}$  para activar la Taq ADN polimerasa, 45 ciclos de 10 segundos a  $95\ ^\circ\text{C}$ , 10 segundos a  $60\ ^\circ\text{C}$  (temperatura de unión de los cebadores), y 10 segundos a  $72\ ^\circ\text{C}$ , momento en el que se midió la señal de fluorescencia. Para comprobar que la PCR y los primers utilizados funcionaron correctamente, se realizó un protocolo de disociación por calor (desde  $65$  hasta  $100\ ^\circ\text{C}$ ) después del proceso de PCR.

La cuantificación relativa de los niveles de ARNm en todos los casos se realizó mediante el método comparativo  $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$  (Livak y Schmittgen, 2001), y los valores de expresión obtenidos se normalizaron utilizando los genes constitutivos *CaUBI3* para pimiento y *SmeIACT* para berenjena.

Los experimentos se repitieron tres veces, determinando así el ciclo umbral (CT) por triplicado, utilizando tres muestras biológicas distintas. También se emplearon controles negativos sin ADNc en todas las reacciones de PCR llevadas a cabo.