



UNIVERSITAT  
POLITÈCNICA  
DE VALÈNCIA



# Optimización de ensayos para evaluar la respuesta a estrés del mutante procera de tomate

Trabajo Final de Máster

Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas  
Máster en Biotecnología Molecular y Celular de Plantas

**Directores:**

Dra. Esther Carrera Bergua

Dr. Antonio Serrano Mislata

**Tutora UPV:**

Dra. M<sup>o</sup> Pliar López Gresa

**María González Blanco**

## Resumen

Uno de los retos principales de los biotecnólogos del siglo XXI es el desarrollo de cultivos más productivos y resistentes a condiciones ambientales adversas. Ante una situación de estrés las plantas desarrollan estrategias de defensa que van ligadas a una reducción del crecimiento. Las proteínas DELLA son reguladores clave de esta respuesta coordinada y, por tanto, han constituido desde su descubrimiento en una herramienta con la que mejorar diversos aspectos agronómicos. Sin embargo, modificar la actividad DELLA también puede provocar efectos secundarios no deseados en los cultivos como un descenso en la productividad o en la tolerancia al ataque por patógenos. Uno de los objetivos de nuestro grupo es generar nuevos alelos DELLA que mejoren específicamente caracteres de interés biotecnológico pero minimizando los efectos no deseados.

En este TFM se han establecido ensayos con los que evaluar la tolerancia a estrés del mutante *procera (pro)* tomate, con pérdida de función DELLA. Estos ensayos son esenciales para poder evaluar en el futuro la actividad en un cultivo de los nuevos alelos DELLA generados. En concreto, se han optimizado ensayos de estrés salino moderado y de tratamiento con metil-jasmónico, como simulación de estrés biótico. Sorprendentemente, nuestro estudio indica que *pro* no es más sensible al estrés salino que el silvestre. Al contrario, la activación de respuestas defensivas dependientes de MeJA sí está afectada en *pro*, lo que apoya una menor tolerancia a estrés biótico.

**Palabras clave:** Tomate; Giberelinas; PROCERA; Estrés salino; Hormonas

## **Abstract**

One of the main challenges for biotechnologists in the 21st century is the development of crops that are more productive and resistant to adverse environmental conditions. Under stress, plants develop defense strategies linked to a reduction in growth. DELLA proteins are critical regulators of this coordinated response and have been a tool to improve various agronomic aspects since their discovery. However, modifying DELLA activity can also lead to undesirable side effects in crops, such as decreased productivity or tolerance to pathogen attack. One of the objectives of our group is to generate new DELLA alleles that specifically improve traits of biotechnological interest while minimizing undesirable effects.

In this Master's thesis, we have established assays to evaluate the stress tolerance of the *procera* (*pro*) tomato mutant with loss of DELLA function. These assays are essential to assess the activity of the new DELLA alleles generated in a crop. Specifically, moderate salt stress and methyl jasmonate treatment assays have been optimized to simulate biotic stress. Excitingly, our study indicates that *pro* tomato plants are not more sensitive to salt stress than wild-type. However, activation of MeJA-dependent defensive responses is impaired in *pro* plants, suggesting a lower tolerance to biotic stress.

**Key words:** Tomato; Gibberellins; PROCERA; Salt stress; Hormones

## Índice

1. Introducción .....	3
1.1. Contexto actual.....	3
1.2. Ruta de biosíntesis de GAs.....	5
1.3. Ruta de señalización hormonal mediada por giberelinas .....	6
1.3.1. Percepción y señalización de giberelinas. Formación del complejo GA-GID1-DELLA..	6
1.3.2. Las proteínas DELLA.....	7
1.3.2.1. Estructura .....	7
1.3.2.2. Modo de acción.....	7
1.3.3. Regulación del balance entre crecimiento y defensa mediada por las DELLA .....	8
1.4. Respuesta de tomate a estrés abiótico .....	10
2. Objetivos .....	13
3. Materiales y métodos .....	14
3.1. Material vegetal.....	14
3.2. Germinación de semillas y paso a invernadero .....	14
3.2.1. Diseño experimental de ensayos de estrés salino .....	14
3.2.1.1. Análisis del desarrollo inflorescente y fructificación en plantas sometidas a estrés salino	15
3.2.2. Diseño experimental de los ensayos de sensibilidad a MeJA .....	16
3.2.2.1. Tratamiento por riego de MeJA en plantas jóvenes.....	16
3.2.2.2. Cultivo <i>in vitro</i> de plántulas en presencia de MeJA .....	16
3.3. Cuantificación de hormonas.....	17
3.4. Cuantificación de la expresión génica.....	18
3.4.1. Extracción de RNA y síntesis de cDNA.....	18

3.4.2.	PCR cuantitativa (qPCR).....	18
3.5.	Análisis de datos.....	20
4.	Resultados y discusión.....	21
4.1.	Ensayos de estrés salino .....	21
4.1.1.	Optimización de los ensayos .....	21
4.1.2.	Análisis del desarrollo de la inflorescencia y de la fructificación en plantas D+ y <i>pro</i> bajo estrés salino .....	22
4.1.2.1.	Desarrollo de la inflorescencia.....	22
4.1.2.2.	Desarrollo de los frutos .....	23
4.2.	Cuantificación hormonal en las plantas D+ y <i>pro</i> bajo estrés salino .....	25
4.2.1.	Niveles de las hormonas del crecimiento bajo condiciones de salinidad .....	26
4.2.2.	Niveles de hormonas de estrés bajo condiciones de salinidad .....	27
4.3.	Cuantificación de flavonoles .....	28
4.4.	Expresión de genes de defensa.....	29
4.5.	Ensayos con tratamiento de MeJA .....	31
4.5.1.	Optimización de los ensayos .....	31
4.5.2.	Expresión de genes de síntesis de SGAs bajo tratamiento con MeJA.....	31
4.5.3.	Estudio de los efectos inhibidores del MeJA en el crecimiento de la raíz <i>in vitro</i> .....	33
5.	Discusión.....	35
6.	Bibliografía .....	40

# 1. Introducción

## 1.1. Contexto actual

La Comisión Europea puso en marcha en diciembre de 2019 el “Pacto Verde” (“European Green Deal”), una propuesta ambiciosa para gestionar el problema actual y futuro del cambio climático y alcanzar una economía sostenible. Los objetivos principales de este pacto son reducir en un 55% las emisiones netas de gases de efecto invernadero para 2030, desacoplar el crecimiento económico del uso de recursos y realizarlo de manera unánime y uniforme entre los países miembros (Comisión Europea, 2021). Uno de los pilares fundamentales para conseguir estos objetivos es la estrategia “Farm to Fork” (**Fig. 1**) para alcanzar una producción alimentaria sostenible (Comisión Europea, 2021). Las iniciativas de la estrategia “Farm to Fork” son la prevención del malgasto de comida y alcanzar la sostenibilidad en la producción, procesamiento, distribución y consumo de esta.



**Figura 1.** Esquema de las iniciativas Farm to Fork de la Comisión Europea. Imagen tomada de [https://ec.europa.eu/food/horizontal-topics/farm-fork-strategy\\_en](https://ec.europa.eu/food/horizontal-topics/farm-fork-strategy_en)

Para una producción sostenible se busca mejorar el rendimiento de las cosechas usyo menos recursos en aras de la protección de la biodiversidad. Con cosechas más productivas se reduciría el área destinada al monocultivo, una de las prácticas agrícolas actuales que más atenta contra la biodiversidad. También se requieren plantas más resilientes al ataque por patógenos y tolerantes a

los estreses medioambientales para evitar en la medida de lo posible el uso de pesticidas y conseguir una producción estable a pesar de los cambios en el clima. Para conseguir estas mejoras una estrategia a adoptar sería el uso de herramientas biotecnológicas siempre y cuando se combinen con otras prácticas como, por ejemplo, la agricultura de precisión.

El tomate (*Solanum lycopersicum*) es la hortaliza con mayor volumen de producción a nivel mundial (FAOSTAT, 2020). Forma parte de la familia de las solanáceas (*Solanaceae*) y se ha convertido en un organismo modelo muy usado en la biotecnología vegetal, sobre todo en estudios de especies de cultivo. Es un organismo diploide, fácil de cruzar y cultivar en invernaderos y del que existen protocolos de transformación eficientes (Shohat *et al.*, 2021). Esto lo convierte en una buena diana para dicha mejora de cultivos planteada en el Pacto Verde. Las investigaciones para la mejora de tomate se han centrado desde elementos del metabolismo especializado como los metabolitos secundarios organolépticos (Ahiakpa *et al.*, 2021) hasta otros más involucrados en el desarrollo de la planta como genes de identidad de órgano floral o el papel de las fitohormonas en los procesos de desarrollo (Quinet *et al.*, 2019).

Las fitohormonas (hormonas vegetales) son moléculas señalizadoras que regulan todo tipo de procesos fisiológicos fundamentales para el crecimiento y supervivencia de la planta. Las fitohormonas actúan en órganos o tejidos distintos del lugar de síntesis y son activas a bajas concentraciones gracias a la eficiencia de sus vías de señalización. Los principales grupos de hormonas vegetales descritos hasta la fecha son: ácido abscísico (ABA), giberelinas (GAs), ácido jasmónico (JA), ácido salicílico (SA), citoquininas (CKs), auxinas, brasinoesteroides (BRs), etileno (ET) y estrigolactonas. El estudio de la síntesis y señalización de las fitohormonas ha permitido un mayor entendimiento de los procesos biológicos que acontecen en la planta a lo largo de su desarrollo. La biotecnología de fitohormonas ha dado visibles resultados en la mejora de la producción de cultivos y la tolerancia de estos a diversos tipos de estrés (Wani *et al.*, 2016), convirtiéndola en una herramienta puntera en la mejora de cultivos.

Las GAs regulan múltiples procesos durante la vida de la planta incluyendo la germinación de las semillas, la elongación del tallo, la expansión de las hojas, la transición floral, el desarrollo de las flores, frutos y semillas y el establecimiento de mecanismos de defensa frente a estrés de tipo abiótico y biótico (Gao y Chu, 2020). La manipulación de la ruta de señalización por GAs tiene un gran potencial para la mejora de los cultivos. Por ejemplo, mutaciones en su biosíntesis o en su ruta

de señalización fueron seleccionadas inadvertidamente durante la revolución verde acontecida en los años sesenta. Las variedades semienanas de trigo y arroz resistentes al encamado del tallo fueron las protagonistas de esa revolución en la que se aumentó en gran medida la productividad de los cultivos. Los dos tipos de mutaciones responsables de estas variedades fueron la pérdida de función del gen *SD1* que codifica la enzima GA20ox2, catalizadora de la síntesis de GAs, en arroz (Monna *et al.*, 2002) y la ganancia de función en *Rht*, un gen que codifica una proteína DELLA, regulador negativo de la ruta de señalización de GAs, en trigo (Peng *et al.*, 1999).

Entre las estrategias usadas para mejorar las características de los cultivos se encuentran la aplicación exógena de GAs o de sus inhibidores (Chauhan *et al.*, 2020). Estas aproximaciones han dado buenos resultados pero, dado el alto coste de producción de las GA sintéticas y la aparición de efectos pleiotrópicos no deseados, la ingeniería genética de la ruta de síntesis o señalización de las GAs representa una estrategia prometedora para el aumento de la productividad de un cultivo como el tomate bajo condiciones ambientales no idóneas como consecuencia de los efectos del cambio climático (Gao y Chu, 2020).

## 1.2. Ruta de biosíntesis de GAs

Las GAs son fitohormonas diterpenoides tetracíclicas. El precursor primario de la ruta de biosíntesis es el *trans*-geranilgeranil difosfato (GGPP) el cual es sustrato de la enzima *ent*-copalil difosfato sintasa. Esta cicla el GGPP para dar el *ent*-kaureno (Hedden, 2020).

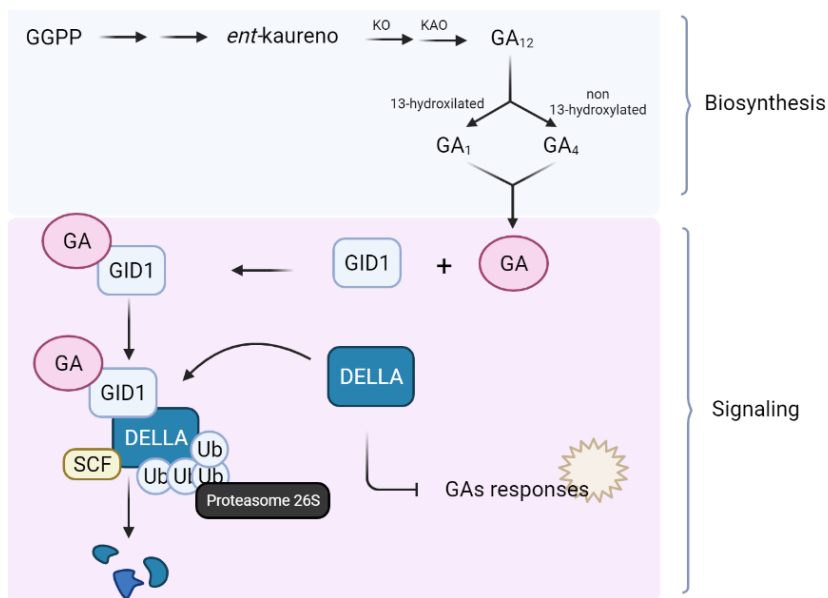
El *ent*-kaureno es sustrato de una reacción catalizada por dos enzimas citocromo P450 monoxigenasas, la *ent*-kaureno oxidasa (KO) y la ácido *ent*-kaurenico oxidasa (KAO). Esta reacción enzimática da como resultado la GA<sub>12</sub>. La GA<sub>12</sub> corresponde a la primera GA de la ruta de biosíntesis a pesar de que no presente actividad hormonal. Aunque se han descrito 136 GAs, solo presentan actividad biológica la GA<sub>1</sub> y GA<sub>4</sub> y, en menor medida, la GA<sub>3</sub> y la GA<sub>7</sub> (Hedden, 2020). La síntesis de las GAs bioactivas se da gracias a diversas enzimas de tipo 2-ODD principalmente. La ruta ramifica desde la GA<sub>12</sub> dya las hormonas 13-hidroxiladas como la GA<sub>1</sub> por un lado, y las no hidroxiladas en el carbono 13 como la GA<sub>4</sub> por el otro (**Figura 2**).



### 1.3. Ruta de señalización hormonal mediada por giberelinas

#### 1.3.1. Percepción y señalización de giberelinas. Formación del complejo GA-GID1-DELLA

Las GAs bioactivas son percibidas por el receptor soluble GIBBERELIN INSENSITIVE DWARF 1 (GID1), descrito por primera vez en arroz (Ueguchi-Tanaka *et al.*, 2005). Mientras que en esta especie solo se encuentra un gen que codifica GID1, en *Arabidopsis thaliana* (*Arabidopsis*) y tomate se han descrito tres homólogos, GID1a/GID1b/GID1c y GID1ac/GID1b-1/GID1b-2 respectivamente. GID1 presenta dos motivos principales, el CXE, que funciona como “bolsillo” de unión a GAs, y el dominio de extensión N-terminal (N-Ex). Cuyo las GAs se unen a GID1, este cambia de conformación en el motivo N-Ex, que cierra el bolsillo formado por el motivo CXE. Esta nueva conformación tiene gran afinidad por las proteínas DELLA. La formación del complejo GA-GID1-DELLA favorece la interacción de la DELLA con el complejo SCF (SKP1, CULLIN, F-BOX). La proteína F-Box de este complejo se llama SLEEPY1 (SLY1) en *Arabidopsis* (McGinnis *et al.*, 2003) y GID2 en el caso de arroz (Sasaki *et al.*, 2003) y tomate (Q. Liu *et al.*, 2016). SLY1/GID2 interacciona con la DELLA para catalizar su poli-ubiquitinación y degradación mediada por el proteasoma 26S. Las DELLAs son reguladores negativos de la ruta de señalización de las GAs, por lo que su degradación permite la activación de la respuesta génica dependiente de GAs (**Fig. 2**).



**Figura 2.** Esquema de la síntesis y señalización de las giberelinas. Realizado con BioRender ([www.biorender.com](http://www.biorender.com))

### **1.3.2. Las proteínas DELLA**

Para que una planta pueda sobrevivir hasta alcanzar el éxito reproductivo debe ser capaz de responder de manera rápida y eficaz a las señales ambientales, tanto bióticas como abióticas. Para ello dispone de redes de señalización de fitohormonas que suelen funcionar como inhibidores de inhibidores. Esta estrategia da como resultado una respuesta rápida ya que es más fácil degradar una proteína que inhiba la respuesta que promover la biosíntesis de una proteína activadora. El caso de las GAs no es distinto, siendo las DELLAs el elemento inhibidor de la ruta de señalización. En *Arabidopsis* se han descrito cinco genes DELLA, *GAI*, *RGA*, *RGL1*, 2 y 3; mientras que en tomate solo se ha descrito uno, *PROCERA* (*PRO*).

#### **1.3.2.1. Estructura**

Las DELLA forman un subgrupo dentro de la familia de factores de transcripción GRAS. Como todas las proteínas de la familia, poseen un dominio GRAS C-terminal muy conservado que actúa como regulador transcripcional y que contiene dos repeticiones de 7 leucinas (LHRI y LHRII) y los subdominios VHIID, PFYRE y SAW (Bolle, 2004; Davière y Achard, 2013). Además, las DELLAs se caracterizan por una secuencia N-terminal variable que contiene dos dominios: el dominio DELLA, que le confiere el nombre, y el dominio TVHYNP. Estos dominios N-terminal interactúan por una parte con el complejo GA-GID1 y por otra con el SLY1/GID2 para su posterior degradación (Davière y Achard, 2013; Hirano *et al.*, 2012; Thomas *et al.*, 2016). Aunque las DELLA se localizan principalmente en el núcleo de las células, no presentan dominio de unión a DNA.

#### **1.3.2.2. Modo de acción**

Las DELLAs modulan la actividad de más de 300 factores de transcripción (TFs) y reguladores transcripcionales mediante el establecimiento de interacciones proteína-proteína (Van De Velde *et al.*, 2017). A pesar de que no se ha demostrado su unión directa a ADN, las DELLA regulan la transcripción de genes diana mediante al menos tres mecanismos diferentes (Thomas *et al.*, 2016):

- 1) Secuestro de TFs para evitar la transcripción del gen diana: Los primeros TFs cuya interacción con las DELLA fue demostrada fueron miembros de la familia

PHYTOCHROME INTERACTING FACTORS (PIFs), en concreto PIF3 y PIF4 (De Lucas *et al.*, 2008; Jinrong Peng y Harberd, 1997). Estos son TFs del tipo bHLH que estimulan el crecimiento de la planta a través de la activación de genes implicados en elongación celular. Las DELLAs inhiben la actividad transcripcional de PIF3/4 mediante una interacción con el dominio bHLH de unión a ADN, siendo esta la base molecular principal del antagonismo de las GAs y la luz en el proceso de elongación del hipocotilo (Thomas *et al.*, 2016). Otros TFs que interaccionan con las DELLAs de esta forma son ALCATRAZ (ALC) (Arnaud *et al.*, 2010), implicado en el desarrollo del fruto; o GLABRA1 (GL1), que participa en el desarrollo de tricomas (Qi *et al.*, 2011).

- 2) Transactivación junto a TFs: También se ha visto que las DELLAs actúan en regiones reguladoras de la transcripción donde la interacción entre DELLAs y TFs da como resultado un aumento de la expresión del gen diana. Este es el caso de algunos TFs de la familia *ARABIDOPSIS RESPONSE REGULATOR* (ARR) de tipo B (ARR1, 2 y 14), reguladores positivos de la señalización por CKs. La capacidad de las DELLA de actuar como co-activadores de la transcripción junto a ARRs explica la regulación antagónica de las GAs y CKs en el crecimiento del meristemo apical de la raíz y en el desarrollo escotomorfogénico (Marín de la Rosa *et al.* 2015).
- 3) Interacción con otros reguladores transcripcionales: Las proteínas DELLA también interaccionan con otros reguladores transcripcionales como las proteínas JAZ, reguladores negativos de la señalización mediada por JA. Las proteínas JAZ secuestran a MYC2, el TF encargado de activar la expresión de genes de respuesta a JA. Las DELLAs compiten activamente con MYC2 por la unión a JAZ. En una situación de acumulación de DELLAs, estas secuestran a JAZ dejando libre a MYC2 para activar la transcripción de los genes de respuesta. La interacción DELLA-JAZ es central en la dicotomía crecimiento o defensa ante una situación de estrés.

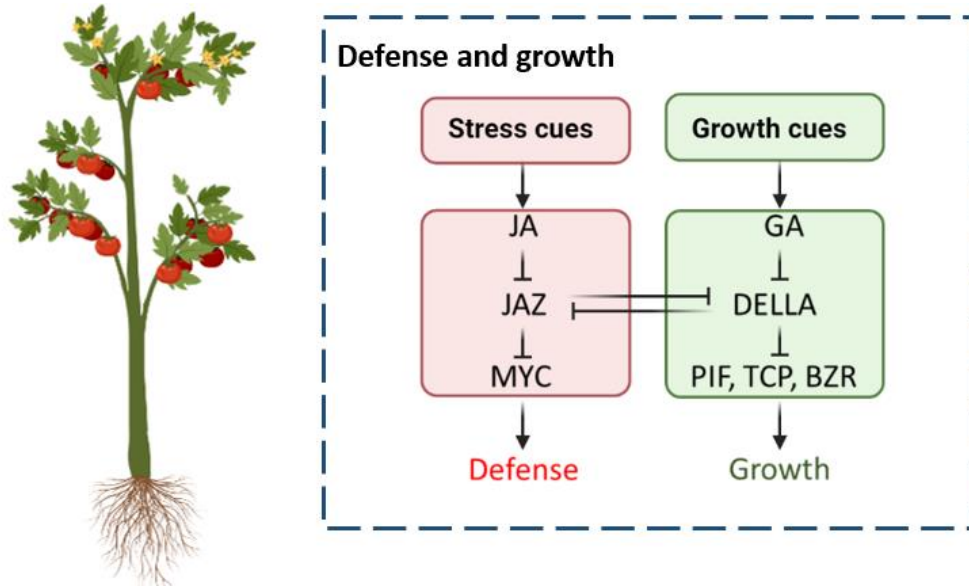
### **1.3.3. Regulación del balance entre crecimiento y defensa mediada por las DELLA**

Ante un estrés se produce un descenso de los niveles de GAs que se traducen en una reducción de la elongación y división celular, y por tanto del crecimiento de la planta, debido a la interacción de las DELLAs con TFs como PIFs, ARRs de tipo B y TCPs. Simultáneamente, las DELLAs inducen

procesos defensivos de la planta: promueven la síntesis de metabolitos protectores como flavonoles y antocianinas (Martinez *et al.*, 2016) y la detoxificación de las especies reactivas de oxígeno (ROS) además de activar otras vías de señalización hormonal como la del JA (explicada anteriormente). Así, mutantes con mayor actividad DELLA, como *gai-1D* en *Arabidopsis*, que codifica una DELLA resistente a la degradación mediada por GAs, son plantas muy resistentes al estrés pero de tamaño reducido (Peng *et al.*, 1997). Por el contrario, mutantes con pérdida de función DELLA, como el *dellaKO* en *Arabidopsis* y *pro* en tomate, presentan un mayor crecimiento, pero también son más sensibles a estreses. De esta forma, las DELLA juegan un papel central en el balance entre crecimiento y defensa ante una situación de estrés (“*growth-defense trade-off*”). Se ha argumentado que esta respuesta coordinada es consecuencia de que las plantas disponen de recursos limitados que han de destinar a crecimiento o a defensa. De esta forma, el establecimiento de las estrategias defensivas conlleva un alto coste metabólico que afecta negativamente al crecimiento. Sin embargo, una serie de trabajos recientes indican que el balance crecimiento-defensa se puede desacoplar y que, por ende, se puede promover el crecimiento de la planta sin afectar a su respuesta defensiva o viceversa (Campos *et al.*, 2016; Jimenez-Aleman *et al.*, 2017; Machado *et al.*, 2017). Por tanto, más allá de la redistribución de recursos, debe haber otras razones que expliquen el freno del crecimiento bajo estrés.

Una fina red de señalización hormonal es la encargada de ajustar crecimiento y defensa en función de las condiciones ambientales (Huot *et al.*, 2014). Las vías de señalización mediadas por GA y JA son centrales en este ajuste. Como se ha comentado previamente, ambas vías convergen a nivel de la interacción DELLA-JAZ. Cuyo las condiciones ambientales son óptimas, niveles altos de GAs provocan la degradación de las DELLA y permiten la activación de genes inductores del crecimiento. En estas condiciones, los niveles de JA son bajos lo que, junto con la degradación de las DELLA, favorece la acumulación de JAZ para inhibir los mecanismos de defensa (Hou *et al.*, 2010; Xie *et al.*, 2016) (**Fig. 3**). Ante infecciones fúngicas y determinados tipos de estrés abiótico, los niveles de JA aumentan y promueven la degradación de los JAZ. En paralelo, se reducen los niveles de GAs y, por tanto, se acumulan DELLAs. Como resultado, a la vez que se frena el crecimiento, TFs como MYC2 o complejos bHLH/MYB son libres de activar las respuestas defensivas de la planta. Un ejemplo en solanáceas es la inducción de genes *GLYCOALKALOID METABOLISM (GAME)* que participan en la biosíntesis de glicoalcaloides esteroideos (SGAs) (Pya *et al.*, 2022). Los SGAs son toxinas naturales que confieren un sabor amargo y proporcionan

a la planta de una estrategia defensiva contra estreses bióticos. La interacción DELLAs-JAZ no sólo regula el balance crecimiento-defensa sino que también es troncal para otros procesos de desarrollo como la formación de tricomas (Qi *et al.*, 2011) o la biosíntesis de metabolitos volátiles (Hong *et al.*, 2012).



**Figura 3.** Esquema de la regulación del balance entre crecimiento y defensa mediado por GAs y JA. Figura realizada con BioRender ([www.biorender.com](http://www.biorender.com)).

#### 1.4. Respuesta de tomate a estrés abiótico

Los cambios ambientales pueden producir situaciones desfavorables para la planta como la sequía, la salinidad o el calor. Las plantas han debido desarrollar mecanismos para detectar estas situaciones y actuar en consecuencia. Las primeras respuestas suelen ser un aumento de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico (Gong *et al.*, 2020), que provoca una cascada de quinasas que señalizan el estrés a nivel local; y un aumento de las especies reactivas de oxígeno (ROS), los cuales también actúan como molécula señalizadora del estrés. Las fitohormonas de estrés como el ABA o el SA son las encargadas de transmitir la información a nivel sistémico dyo una respuesta global de la planta al estrés en cuestión. Las diferentes vías de señalización hormonal tienen un punto de convergencia en regular la estabilidad de las DELLA (Van De Velde *et al.*, 2017).

El estrés salino es uno de los más comunes y nocivos de entre los estreses abióticos. Supone de por sí un estrés múltiple ya que causa estrés osmótico, iónico (debido a la toxicidad del  $\text{Na}^+$ ) y oxidativo (Chaudhry *et al.*, 2022). Limita el intercambio de gases resultado del cierre de los estomas y dificulta la toma de agua por las raíces (Munns y Tester, 2008). Como consecuencia, reduce el porcentaje de germinación de las semillas y el crecimiento general de la planta.

Las plantas disponen de diferentes estrategias para lidiar con el estrés salino. Con el objetivo de reducir el potencial osmótico, y permitir la toma de agua por las raíces, se da una acumulación de osmolitos, como la prolina, glicina o betaína; y azúcares, como la sacarosa o la fructosa. Estos osmolitos y azúcares también cumplen el objetivo de estabilizar proteínas y otros componentes celulares para evitar el daño estructural (Chaudhry *et al.*, 2022). Por otra parte, el estrés salino, al igual que otros estreses, supone una perturbación en el equilibrio de producción y detoxificación de ROS. Una situación de estrés va ligada a nivel celular a un aumento de los ROS lo que produce daños en el ADN y otros compuestos como proteínas o estructuras lipídicas. Para evitar esto la planta dispone de enzimas que toman como sustrato los ROS para dar moléculas inocuas como  $\text{O}_2$  o  $\text{H}_2\text{O}$ . Ejemplos de estas son la superóxido dismutasa (SOD) o la peroxidasa (POD). La primera cataliza la reacción de reducción del ion superóxido ( $\text{O}_2^-$ ) a peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) y es la segunda la encargada de tomar el peróxido para dar  $\text{H}_2\text{O}$  y  $\text{O}_2$ . Una mayor presencia de estas enzimas supone para la planta resiliencia al estrés. La especie de tomate silvestre *Lycopersicon pennellii*, más tolerante a salinidad, presenta mayores niveles de enzimas de detoxificación de ROS que los tomates comerciales (Mittova *et al.*, 2000). Las proteínas DELLA participan en la regulación de la homeostasis redox ya que activan la expresión de genes que codifican enzimas antioxidantes (Achard *et al.*, 2008; Choudhury *et al.*, 2017). Mutantes con fenotipo de acumulación de DELLAs como *SUBIA* en arroz muestran un daño oxidativo menor debido al aumento de los niveles de estas enzimas (Fukao *et al.*, 2006). Por último, otra estrategia común contra el estrés salino es la biosíntesis de metabolitos antioxidantes como los flavonoides y las antocianinas. Las DELLA activan, directa o indirectamente a través de la interacción con JAZ, la expresión de genes implicados en la biosíntesis de estos compuestos (Li *et al.*, 2014; Tan *et al.*, 2019; Xie *et al.*, 2016).

Aparte de señalar el estrés a nivel sistémico, las fitohormonas son también las encargadas de activar las estrategias defensivas para la supervivencia. El ABA es la hormona por excelencia del estrés salino. Participa en la expresión de enzimas antioxidantes, la producción de osmolitos y la

reducción de la conductancia estomática (Yang y Guo, 2018). El ABA actúa sinérgicamente con el SA, el cual estimula la síntesis de la primera y promueve la acumulación de prolina y la detoxificación de los ROS (Senaratna *et al.*, 2000; Zheng *et al.*, 2018). Como se ha comentado, la vía de señalización GAs-DELLA también es importante en la respuesta frente a estrés salino. Aparte de participar directamente en mitigar el estrés oxidativo, las DELLA promueven la biosíntesis de ABA, su transporte a las células guarda de los estomas y, como consecuencia, el cierre de los mismos (Steber *et al.*, 2013; Shohat *et al.*, 2020). El etileno es otra hormona troncal en la señalización y respuesta de diversos estreses. Su participación en el estrés salino aún no está del todo estudiada, pero se ha descrito que ETHYLENE INSENSITIVE 3 (EIN3) y EIN3-LIKE 1 (EIL1), dos TFs promotores de la respuesta génica inducida por etileno, son necesarios para la tolerancia a estrés salino en *Arabidopsis* (Peng *et al.*, 2014). Por otra parte, se ha demostrado que los JAZ ejercen un efecto inhibitor sobre EIN3/EIL1 (Song *et al.*, 2014; Zhu *et al.*, 2011), lo que podría indicar una posible regulación cruzada entre el etileno y las rutas de JA y GAs.

Todo esto permite hipotetizar que el mutante *pro* de tomate debe presentar mayor sensibilidad al estrés salino. Bajo estrés hídrico, las plantas *pro* mostraban una mayor conductancia estomática y, por lo tanto, sensibilidad al estrés, que las plantas silvestres (Nir *et al.*, 2018). Sin embargo, la respuesta de *pro* a estrés salino todavía no ha sido estudiada.

## 2. Objetivos

Este trabajo forma parte del proyecto Prometeo TECNODELLA de la Generalitat Valenciana cuyo objetivo es el desarrollo de nuevos alelos DELLA que permitan modificar ciertos caracteres de interés agronómico, por ejemplo aumentar la tolerancia a estrés, sin efectos secundarios, como el freno del crecimiento.

Dentro del marco del proyecto, el objetivo principal de este trabajo fin de máster ha sido la optimización de ensayos con los que evaluar el papel de *PRO* en la tolerancia a estrés de plantas de tomate. Este es un trabajo previo esencial para estudiar el potencial biotecnológico de los alelos DELLA generados en el grupo. Los objetivos específicos han sido los siguientes:

1. Puesta a punto de ensayos de estrés salino por riego en plantas de tomate cultivar MicroTom.
2. Puesta a punto de ensayos de tratamiento con MeJA *in vitro* y por riego en dichas plantas.
3. Análisis de la tolerancia a estrés de plantas de tomate silvestres y mutantes *pro*. Para ello se han analizado, entre otros, parámetros como fructificación, niveles de hormonas, niveles de flavonoles y expresión de genes de defensa.



### **3. Materiales y métodos**

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

Se usó la variedad de tomate MicroTom Dwarf (D+) en la que se ha corregido la deficiencia en brasinoesteroides de la línea original. El cultivar D+ se caracteriza por su ciclo de vida corto e inflorescencia determinada lo que lo convierte en una variedad muy usada en investigación.

Asimismo se utilizó el mutante *procera* (*pro*) en el mismo fondo genético (Carrera *et al.*, 2012). Este contiene una mutación puntual en el dominio VHIID del gen *PRO* que da lugar a una proteína *PRO* truncada y no funcional (Bassel *et al.*, 2008).

Para la obtención de semillas, estas se extrajeron de frutos maduros, lavaron con agua y esterilizaron con lejía al 30% en agua durante 20 minutos. Tras esto, se volvieron a lavar con agua y secaron en papel de filtro para su posterior almacenamiento a 4°C.

#### **3.2. Germinación de semillas y paso a invernadero**

Se esterilizaron las semillas mediante el mismo procedimiento anterior y se pregerminaron las semillas sobre agar en agua al 0.7% (p/v) en placas de 90 mm de diámetro. Las placas se mantuvieron en cámara de cultivo *in vitro* a 24°C con fotoperiodo de día largo (16 horas de luz, 8 de oscuridad) hasta que las plántulas desarrollaron hipocotilo y radícula. Estas se trasplantaron a macetas de 12 cm de diámetro con turba:vermiculita (1:1) y se cultivaron en invernadero de bioseguridad a 22°C y fotoperiodo de día largo. Las plantas se regaron con 50 mL de solución de Hoagly n°1 suplementada con oligoelementos (solución nutritiva) tres veces por semana.

##### **3.2.1. Diseño experimental de ensayos de estrés salino**

Para el estrés por salinidad se realizaron dos diseños experimentales. El objetivo era someter a las plantas a un estrés moderado, las concentraciones se seleccionaron en base a ensayos previos en el grupo. En primera instancia se usaron tres concentraciones (0, 50 y 100 mM de NaCl en solución nutritiva) y posteriormente se redujeron a dos (0 y 100 mM de NaCl) debido a los resultados obtenidos en el primer experimento. Por genotipo y tratamiento se cultivaron 4 plantas en el primer

experimento y 9 en el segundo. El tratamiento se realizó en plantas con las dos primeras hojas compuestas formadas (aproximadamente un mes desde su paso a invernadero) y consistió en 14 riegos, con una periodicidad de 3 riegos por semana, siendo de 50 mL los primeros cuatro riegos y de 100 mL los siguientes. Este volumen de riego fue el suficiente para empapar el sustrato sin que drenara. Una vez terminado el experimento (dos meses desde el traspaso a invernadero) se recogió en N<sub>2</sub> líquido los folíolos de las dos primeras hojas de la inflorescencia para almacenarlos a -80°C. Las muestras se molieron en morteros de porcelana enfriados con N<sub>2</sub> líquido y se conservaron a -80°C hasta su uso para cuantificación de hormonas y análisis de expresión génica.

### 3.2.1.1. Análisis del desarrollo inflorescente y fructificación en plantas sometidas a estrés salino

Para evaluar el impacto del riego con sal en el desarrollo reproductivo de la planta, se midió la altura de la inflorescencia y los siguientes datos de fructificación: Número total de frutos y peso, número de semillas por fruto y grados Brix (°Brix) de frutos individuales. MicroTom, al presentar crecimiento determinado, genera una inflorescencia terminal. La altura de la inflorescencia se midió desde el inicio del tallo hasta la inflorescencia terminal (**Fig. 4**). Para valorar los °Brix y el número de semillas por fruto se seleccionaron los 16 frutos de mayor peso. Para la medición de °Brix se utilizó un refractómetro manual aplicando una gota de jugo del fruto sobre el prisma que indica la concentración de solutos.



**Figura 4.** Esquema del procedimiento para la medición de la altura de la inflorescencia. Figura modificada de Benlloch *et al.* 2015.

### **3.2.2. Diseño experimental de los ensayos de sensibilidad a MeJA**

Con el objetivo de estudiar el papel que ejercen las DELLAs frente estrés biótico se realizó una aproximación mediante ensayos de sensibilidad a jasmonatos. Los jasmonatos son un grupo de moléculas señalizadoras de estrés compuesto del ácido jasmónico y sus conjugados, entre los que se encuentra el metil-jasmónico (MeJA). Esta molécula presenta actividad biológica como fitohormona (Creelman y Mullet, 2003), por lo que fue la utilizada para los ensayos.

#### **3.2.2.1. Tratamiento por riego de MeJA en plantas jóvenes**

Para el ensayo por riego se realizaron dos diseños experimentales. Se trató con un único riego plantas de cuatro semanas de edad con solución nutritiva suplementada con cuatro concentraciones de MeJA en el primer experimento (0, 25, 50 y 100  $\mu\text{M}$ ) y, teniendo en cuenta los resultados obtenidos, en el segundo experimento se optó por dos concentraciones (0 y 50  $\mu\text{M}$ ). El tratamiento se realizó en 5 plantas en el primer experimento y 8 en el segundo. El volumen de riego fue en ambos casos de 50 mL. A las 24 horas se recogieron los folíolos de la cuarta y quinta hoja en  $\text{N}_2$  líquido y se molieron en mortero de porcelana enfriado en  $\text{N}_2$  líquido. Las muestras se almacenaron a  $-80^\circ\text{C}$  hasta su posterior uso para análisis de la expresión génica.

#### **3.2.2.2. Cultivo *in vitro* de plántulas en presencia de MeJA**

Para los ensayos *in vitro* las semillas se esterilizaron como ya se ha descrito y sembraron en medio 0.7% agar en agua en condiciones de día largo (16:8) para su germinación. Después las plántulas se traspasaron en cabina de flujo a placas cuadradas (24x24 cm) estériles con medio  $\frac{1}{2}\text{MS}$  suplementado con distintas concentraciones de MeJA. En un primer experimento se usaron 5 (0, 5, 10, 15 y 25  $\mu\text{M}$ ), mientras que en un segundo experimento se redujeron a 3 (0, 2.5, 5  $\mu\text{M}$ ). 12 plántulas de cada línea fueron analizadas por concentración de MeJA. Las plántulas se mantuvieron en condiciones de día largo 10 días. Se tomaron fotos de las placas y la longitud de la raíz se midió con el programa ImageJ.

### 3.3. Cuantificación de hormonas

Tras moler en N<sub>2</sub> líquido las muestras, se reservaron entre 100 y 200 mg para este ensayo, apuntando los pesos exactos. Este material fue almacenado a -80°C en tubos de plástico de 2 mL.

Para la extracción de hormonas se le añadió a cada muestra 1 mL del disolvente (80% metanol-1% ácido acético en H<sub>2</sub>O) y 30 µL de una mezcla equivolúmica de tres patrones internos. Los patrones contienen las hormonas a cuantificar deuteradas excepto en el caso del JA, para el que se usó dhJA. La muestra se mantuvo en agitación durante 1 hora a 4°C y se centrifugó 4 minutos a 4°C y 14000rpm. Se reservó el sobrenadante y el precipitado obtenido se resuspendió con otro mL del disolvente para continuar con la extracción en agitación durante 10 minutos a 4°C. Esta muestra se centrifugó en las mismas condiciones que la primera extracción y el sobrenadante obtenido se añadió al anterior. El extracto se incubó toda la noche a -20°C (precipitación de las proteínas). Las muestras se centrifugaron 4 minutos a 14000rpm y se pasó el sobrenadante a un tubo de vidrio. El volumen de todas las muestras se redujo a menos de 400 µL para eliminar el metanol con un rotavapor *SPD1010* (ThermoFisher) sin temperatura.

La purificación de hormonas consistió en una columna de fase reversa (*OASIS® HBL Cartridge*, Waters) y otra de intercambio catiónico (*OASIS® MCX*, Waters). Para equilibrar la primera columna se lavó con 1 mL de acetonitrilo, 1 mL de metanol y 1 mL del disolvente en el que estaban las muestras (H<sub>2</sub>O-1% ácido acético). Las muestras se llevaron a 1 mL con el mismo disolvente, se homogeneizaron en vórtex y se pasaron por la columna de fase reversa. Los tubos de vidrio se lavaron con otro mL del disolvente para añadirlo a la columna. A continuación, se eluyó con 1 mL de 95% metanol-1% ácido acético en H<sub>2</sub>O. Las muestras se colocaron en el rotavapor sin temperatura hasta reducir su volumen a menos 400 µL. Entre columna y columna las muestras se almacenaron toda la noche a -20°C.

Para la última fase de purificación se equilibró la columna de intercambio catiónico con 1 mL de acetonitrilo, 1 mL metanol, 0.5 mL de HCl para regenerarla y 1 mL de disolvente (1% de ácido acético en H<sub>2</sub>O). Se añadió disolvente a las muestras hasta alcanzar un volumen de 1 mL, se homogeneizaron en vórtex y pasaron por la columna. Los tubos de vidrio se lavaron con 1 mL de disolvente y vórtex y se añadió a la columna. Las hormonas ácidas y neutras se eluyeron con 1 mL de metanol puro. Para purificar las hormonas básicas se lavó la columna con 1 mL de 5% de

amoníaco en H<sub>2</sub>O y se eluyó con 1 mL de 65% metanol-5% amoníaco en H<sub>2</sub>O. Todas las muestras se secaron completamente en el rotavapor sin temperatura y se almacenaron a -20°C.

Las hormonas se cuantificaron mediante un espectrómetro de masas Q-Exactive con un analizador de masas (orbitrap) acoplado a un cromatógrafo líquido de alta presión (LC-MS/MS). Para ello, las muestras se diluyeron en 150 µL de 5% acetonitrilo-1% ácido acético en H<sub>2</sub>O y se almacenaron en viales ámbar de HPLC.

### **3.4. Cuantificación de la expresión génica**

#### **3.4.1. Extracción de RNA y síntesis de cDNA**

Para la extracción de RNA se utilizó el kit *NucleoSpin® RNA Plant* (Machery-Nagel, Düren, Alemania) siguiendo las instrucciones del fabricante. Partimos de 150 mg de material vegetal pulverizado. Tras determinar la calidad y concentración del RNA obtenido mediante Nanodrop, este se conservó a -80°C.

La síntesis de cDNA se realizó a partir de 750 ng de RNA con el kit *NZY First-Stry cDNA Synthesis kit* (NZYtech, Life Sciences Research) siguiendo las instrucciones del fabricante. La concentración del cDNA se determinó con Nanodrop. El cDNA se mantuvo a -20°C.

#### **3.4.2. PCR cuantitativa (qPCR)**

En un volumen final de 20 µL, cada mezcla de reacción contenía 1 µL de cDNA (≈200ng), 0.3 µM de los cebadores directo e inverso y *SYBR Premix Ex Taq-Perfect Real Time* (TaKaRa) a 1x. Se usaron placas *MicroAmp® Fast Optical 96-Well Reaction* (Applied Biosystems) y un termociclador *QuantStudio™ 3 System* (Applied Biosystems).

En las muestras tomadas de las plantas del ensayo a estrés salino se cuantificó la expresión de los genes *SUPEROXIDE DISMUTASE (SISOD)*, *PEROXIDASE (SIPOD)*, *ETHYLENE RESPONSIVE 5 (SIER5)*, *ETHYLENE RESPONSIVE FACTOR 1 (SIERF1)* y *CHALCONE SYNTHASE 2 (SICH2)*.

En el caso de las muestras tomadas de plantas regadas con diferentes concentraciones de MeJA se analizó el nivel de expresión de los genes *STEROL SIDE CHAIN REDUCTASE2 (SISR2)*, *GLYCOALKALOID METABOLISM 4, 11 y 12 (SIGAME4, 11 y 12)*. Estos son genes de la ruta de biosíntesis de SGAs, compuestos defensivos frente a patógenos.

El nivel relativo de expresión de estos genes se calculó respecto a los genes de referencia *SIUBI* (en el caso de los ensayos de riego con sal) y *SITIP41* (en el caso de los tratamientos con MeJA). Para ello, se usó el método de doble incremento de Ct ( $\Delta\Delta$ threshold cycle; Livak y Schmittgen, 2001).

Gen	Hebra	Secuencia (5'→3')	Referencia
<i>SIUBI (Solyc07g064130)</i>	<i>Directo</i>	GCCGACTACAACATCCAGAAGG	Liu et al. 2017
<i>SIUBI (Solyc07g064130)</i>	<i>Reverso</i>	TGCAACACAGCGAGCTTAACC	Liu et al. 2017
<i>SISOD (Solyc01g067740)</i>	<i>Directo</i>	TGAATTGGGGTTGAACCATT	Liu et al. 2017
<i>SISOD (Solyc01g067740)</i>	<i>Reverso</i>	GCAGGCACTGTAATCTGCAA	Liu et al. 2017
<i>SIPOD (Solyc11g018800)</i>	<i>Directo</i>	CTTGCCCTAATGCTCTCACC	Liu et al. 2017
<i>SIPOD (Solyc11g018800)</i>	<i>Reverso</i>	GCATCACAACCCTGAACAAA	Liu et al. 2017
<i>SIER5 (Solyc01g095140)</i>	<i>Directo</i>	TATTGGTAAAGATTGGGACATTGA	Liu et al. 2017
<i>SIER5 (Solyc01g095140)</i>	<i>Reverso</i>	TGTCTTCTTGTGTTGTCACCGTTC	Liu et al. 2017
<i>SIERF1 (Solyc03g093610)</i>	<i>Directo</i>	TTTTAGTATCGGATGGACG	Liu et al. 2017
<i>SIERF1 (Solyc03g093610)</i>	<i>Reverso</i>	GGCGGAGAAACAGAAGTA	Liu et al. 2017
<i>SICHS2 (Solyc05g053550)</i>	<i>Directo</i>	GCCTTTGTTTGAACCTCGTCT	Wu et al. 2020
<i>SICHS2 (Solyc05g053550)</i>	<i>Reverso</i>	GAAATGCCTAACGGTTGG	Wu et al. 2020
<i>SITIP41 Solyc10g049850</i>	<i>Directo</i>	AGATGAACTGGCAGATAATGG	Pya et al. 2022
<i>SITIP41 Solyc10g049850</i>	<i>Reverso</i>	CATCAACCCTAAGCCAGAAA	Pya et al. 2022
<i>SISR2 Solyc02g069490</i>	<i>Directo</i>	GGCCAAATGTCAAGGGTCACT	Pya et al. 2022
<i>SISR2 Solyc02g069490</i>	<i>Reverso</i>	ACCCCGAACCCATTGATCA	Pya et al. 2022
<i>SIGAME4 Solyc12g006460</i>	<i>Directo</i>	CTTCAATGTGTGGTGATCCAAA	Pya et al. 2022
<i>SIGAME4 Solyc12g006460</i>	<i>Reverso</i>	CCATAATTGTTGGCTTCCAAA	Pya et al. 2022

<i>SIGAME11</i> <i>Solyc07g043420</i>	<i>Directo</i>	TGGTCCTGAGAATCCTCCACA	<i>Pyra et al. 2022</i>
<i>SIGAME11</i> <i>Solyc07g043420</i>	<i>Reverso</i>	GCTCCAATGAAGCGTGGTACAC	<i>Pyra et al. 2022</i>
<i>SIGAME12</i> <i>Solyc12g006470</i>	<i>Directo</i>	TATGACTGCCGGTCTCTCCG	<i>Pyra et al. 2022</i>
<i>SIGAME12</i> <i>Solyc12g006470</i>	<i>Reverso</i>	GATAGTTCCAATAATGAGGGCAATCA	<i>Pyra et al. 2022</i>

**Tabla 1.** Secuencia de los cebadores usados en los estudios de expresión génica de salinidad (arriba) y tratamiento con MeJA (abajo).

### 3.5. Análisis estadístico

Los resultados de los experimentos se trataron con el programa GraphPad Prism 8.0. Se realizaron las pruebas de Levene y Kolmogorov-Smirnov para comprobar que los datos presentaban homocedasticidad y que se ajustaban a una distribución normal respectivamente. Dependiendo de la naturaleza del conjunto de datos, se analizaron mediante pruebas ANOVA de una y dos vías, *nested* ANOVA o prueba t.

## 4. Resultados

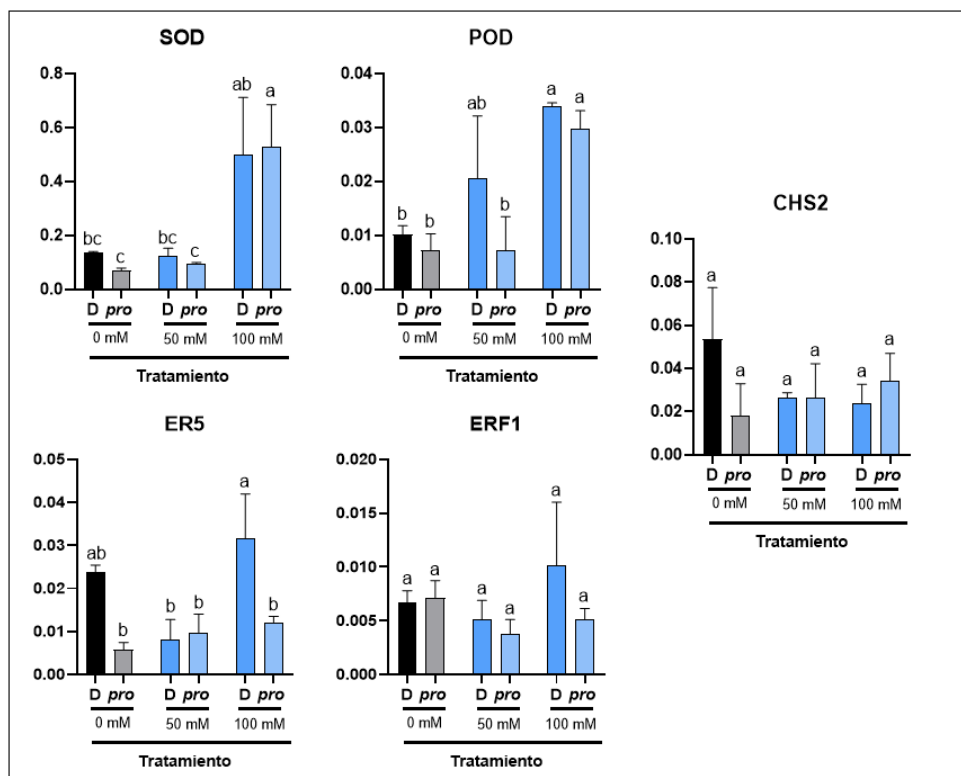
### 4.1. Ensayos de estrés salino

#### 4.1.1. Optimización de los ensayos

En primera instancia se expusieron a los genotipos D+ y *pro* a tres tratamientos de salinidad: 0, 50 y 100mM. De estas plantas se estudió la expresión de genes de defensa. Para el experimento se escogieron dos genes de detoxificación de ROS, *SISOD* y *SIPOD*; dos de la ruta de señalización del etileno, *SIER5* y *SIERF1*; y uno de la ruta de biosíntesis de flavonoides, *SICH2* (**Fig. 5**). Los genes *SISOD* y *SIPOD* codifican enzimas antioxidantes primordiales para la detoxificación de los ROS (explicado anteriormente). Los genes *SIER5* y *SIERF1* codifican proteínas partícipes en la señalización por etileno. ER5 es una chaperona de tipo Hsp70, este tipo de proteínas funcionan manteniendo la estabilidad estructural de las proteínas ante desecación. ERF1 pertenece a una familia de TFs regulada por etileno y se sabe que participa en la respuesta defensiva a estreses abióticos como sequía o salinidad (Klay *et al.*, 2018). Por último, *CHALCONE SYNTHASE2* (*SICH2*) es una de las primeras enzimas de la ruta de síntesis de flavonoides, estos compuestos se sintetizan ante un estrés y le permiten a la planta una mejor detoxificación de los ROS.

De los resultados obtenidos se concluyó que un tratamiento de 14 riegos con 50 mM de NaCl es insuficiente para activar la transcripción de estos genes defensivos en ambos genotipos. Sin embargo, tras 14 riegos de 100 mM de NaCl sí se observó activación de la mayoría de los marcadores (**Fig. 5**). Por tanto, estas son las condiciones que se utilizaron en los siguientes ensayos. Además, se aumentó el número de réplicas biológicas a fin de reducir la desviación de los resultados.





**Figura 5.** Expresión génica de plantas de tomate D+ (D) y *pro* tras 14 riegos de 0, 50 y 100mM NaCl. Las barras indican la media y desviación típica de 3 réplicas biológicas. Se realizó la prueba ANOVA de dos vías para los análisis estadísticos. Letras distintas representan  $p < 0.05$ .

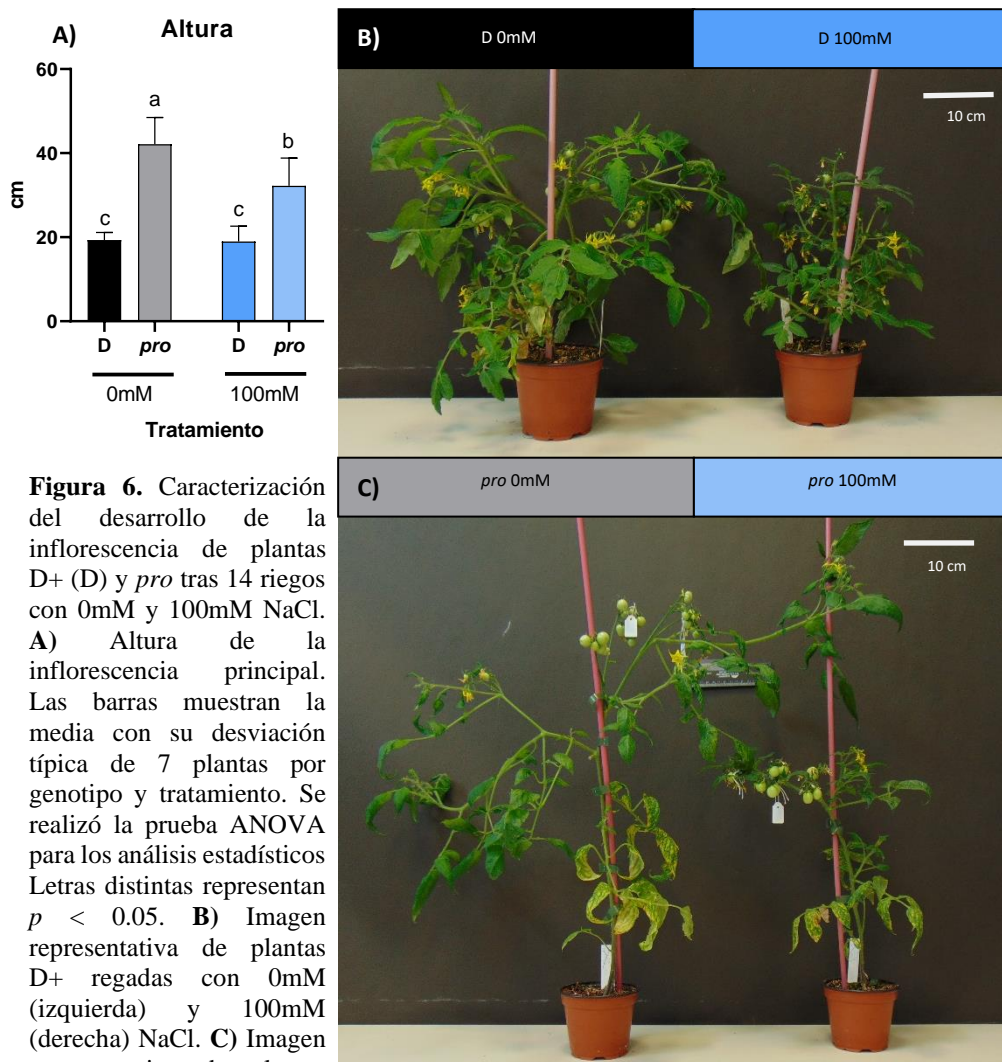
#### 4.1.2. Análisis del desarrollo de la inflorescencia y de la fructificación en plantas D+ y *pro* bajo estrés salino

De las plantas regadas con 0 y 100mM NaCl se analizó el impacto del tratamiento sobre el desarrollo reproductivo. Para ello, se cuantificó la altura de la inflorescencia, así como el número y peso de los tomates y el número de semillas y concentración de solutos en grados Brix ( $^{\circ}$ Brix) de los tomates.

##### 4.1.2.1. Desarrollo de la inflorescencia

En el caso de las plantas D+ no se vio afectada la altura con el riego de 100mM de NaCl (**Fig. 6A**). En cambio, el tratamiento en las plantas *pro* conllevó una reducción significativa de la misma (**Fig. 6A**). Así, D+ presentó una reducción del 1,67% y *pro* del 23,53%. Esto podría indicar una mayor

sensibilidad por parte de *pro* al estrés de salinidad. Además, en ambos genotipos se observó una reducción aparente en la frondosidad y el área foliar en las plantas tratadas (**Fig. 6B y C**).

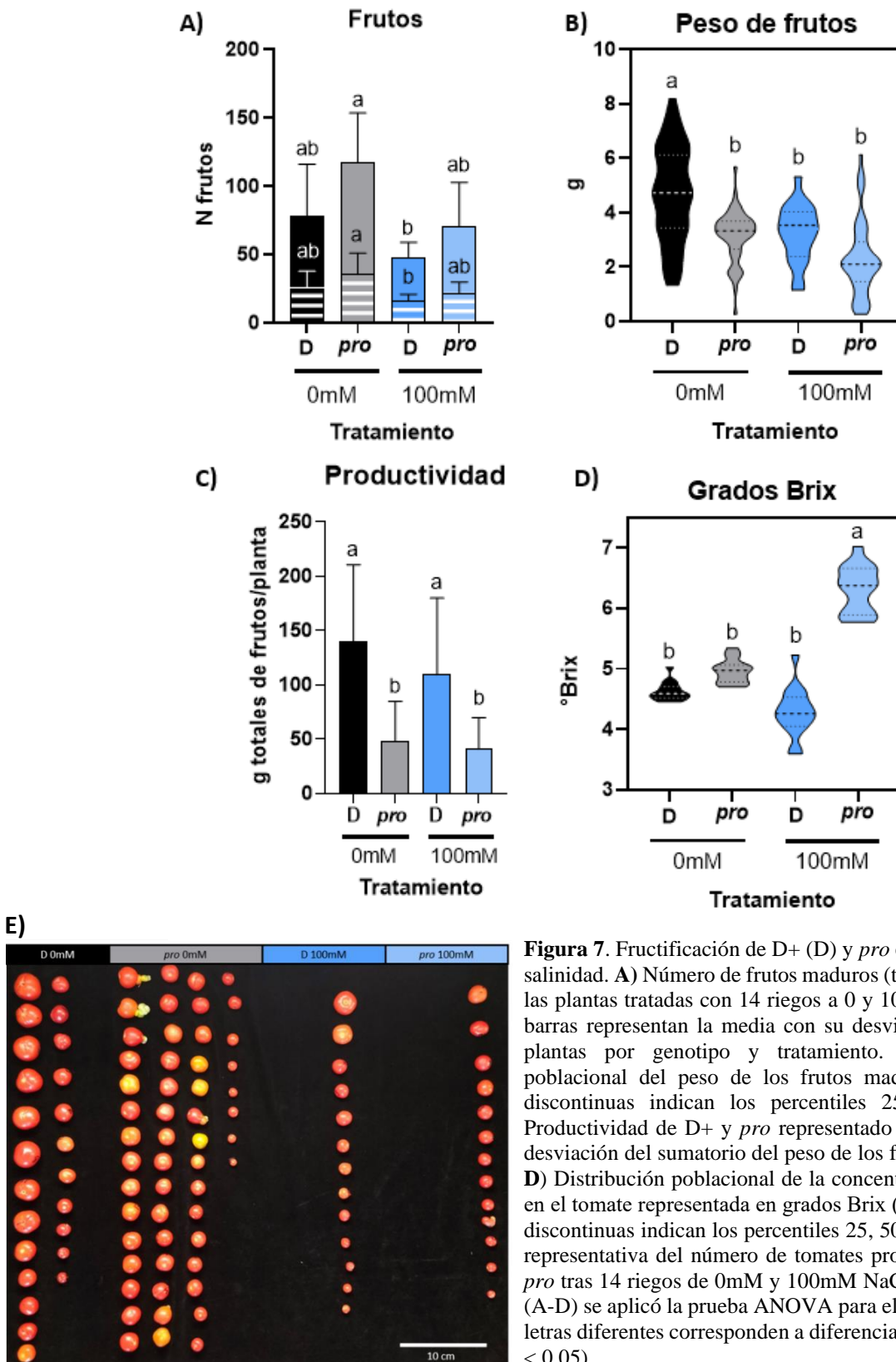


**Figura 6.** Caracterización del desarrollo de la inflorescencia de plantas D+ (D) y *pro* tras 14 riegos con 0mM y 100mM NaCl. **A)** Altura de la inflorescencia principal. Las barras muestran la media con su desviación típica de 7 plantas por genotipo y tratamiento. Se realizó la prueba ANOVA para los análisis estadísticos. Letras distintas representan  $p < 0.05$ . **B)** Imagen representativa de plantas D+ regadas con 0mM (izquierda) y 100mM (derecha) NaCl. **C)** Imagen representativa de plantas *pro* regadas con 0mM (izquierda) y 100mM (derecha) NaCl.

#### 4.1.2.2. Desarrollo de los frutos

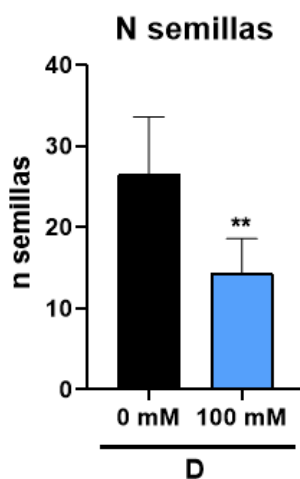
El estrés salino afecta negativamente a la productividad del tomate, reduciendo tanto el número como el tamaño de los frutos (Saito *et al.*, 2015). Con el objetivo de determinar cómo las DELLA influyen en la fructificación del tomate bajo estrés salino se cuantificaron parámetros de

productividad (el número de tomates y su peso) y de calidad del tomate (concentración de solutos en °Brix) en plantas *D+* y *pro*.



En ambos genotipos se observó una reducción significativa, pero de similar magnitud, en el número de tomates producidos en condiciones de salinidad, siendo de 61,7% en D+ y de 59% en *pro* (**Fig. 7A y E**). Al estudiar el peso de los frutos se observó que tanto en D+ como en *pro* el tratamiento con NaCl supuso una reducción del peso del 35.17% y 33.18% respectivamente (**Fig. 7B**). En el caso del genotipo *pro*, debido a la desviación en la población, esta reducción no es significativa (**Fig. 7B**). Para sacar una idea más clara se representó la productividad como el peso medio total de frutos por planta (**Fig. 7C**). Los resultados muestran que D+ es más productiva que *pro* y que la productividad apenas se vio afectada por el tratamiento en ninguno de los genotipos.

La cantidad de solutos disueltos es un indicador estándar de la calidad del tomate. La medida que se tomó fue los °Brix de tomates maduros. Se ha estudiado que los tomates de plantas expuestas a estrés salino moderado (< 160 mM) contienen mayores solutos disueltos que los tomates de plantas crecidas en condiciones óptimas (Yin *et al.*, 2010). Mientras que D+ no presentó diferencias en los °Brix, las plantas *pro* produjeron tomates de mayor °Brix bajo condiciones de salinidad (**Fig. 7D**). La presencia de semillas en el fruto favorece el aumento de solutos disueltos y, por tanto, los °Brix.



Los tomates de las plantas D+ tratadas contienen un número de semillas menor que las plantas D+ sin tratar (**Fig. 8**), lo que explica en parte por qué no aumentan los °Brix con el tratamiento en este genotipo. Sin embargo, la línea mutante *pro*, aun siendo partenocárpica, presenta tomates con mayor concentración de solutos que las plantas D+, esto concuerda con lo descrito por Carrera *et al.* (2012).

**Figura 8.** Número de semillas de las plantas D+ (D) en condiciones de riego con 0 y 100 mM de NaCl. Las barras indican la media y desviación de 7 plantas. Se realizó la prueba t para los análisis estadísticos. \*\* representa valor  $p < 0.01$ .

#### 4.2. Cuantificación hormonal en las plantas D+ y *pro* bajo estrés salino

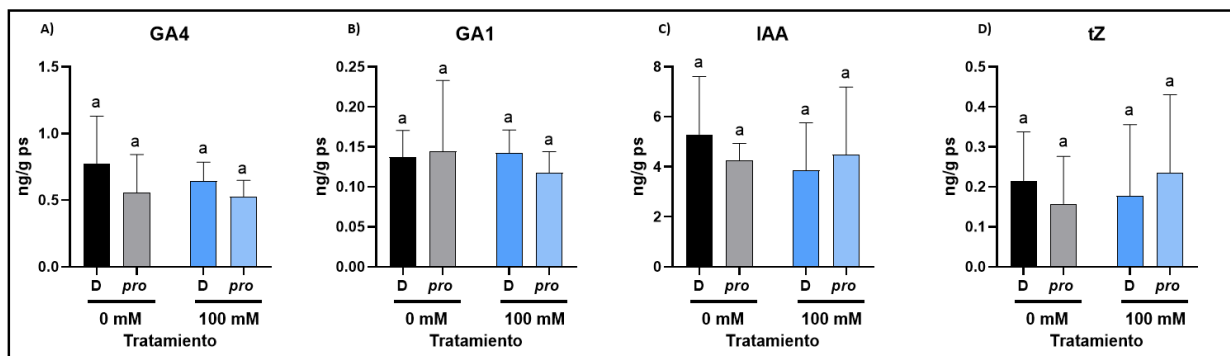
Para determinar cómo la ausencia de la actividad DELLA afectaba al estatus hormonal de las plantas bajo estrés salino, se cuantificaron hormonas de actividad predominante en la regulación del crecimiento como giberelinas (GA<sub>4</sub>, GA<sub>1</sub>), ácido indolacético (IAA) y *trans*-zeatina (tZ); así como otras consideradas como hormonas de estrés (ABA, JA, SA y Etileno).

#### 4.2.1. Niveles de las hormonas del crecimiento bajo condiciones de salinidad

Las GAs, como ya se ha descrito, influyen activamente en el crecimiento y la defensa de las plantas mediante la regulación de la estabilidad de las proteínas DELLA. En este experimento, los niveles de las GAs bioactivas, GA<sub>1</sub> y GA<sub>4</sub>, no se ven influidos por genotipo ni tratamiento (**Fig. 9 A y B**). En la literatura sí que se ha descrito como el estrés salino reduce los niveles de GAs (Yu *et al.*, 2020), por lo que nuestros datos indican que posiblemente no se han cuantificado en el órgano correcto o que el tratamiento fue demasiado ligero, ya sea por magnitud o duración del estrés.

Además, se observó que las concentraciones de otras hormonas del crecimiento como IAA y tZ tampoco dependían de línea ni tratamiento (**Fig. 9 C y D**). Los estudios que relacionan auxinas y estrés salino se enfocan en la regulación del crecimiento de la raíz (Iglesias *et al.*, 2010). El estrés salino conlleva una inhibición del crecimiento del sistema radicular debido a la reducción del meristemo apical de la raíz. Se ha estudiado en *Arabidopsis* que este suceso se debe en parte a una menor expresión de transportadores y receptores de auxinas y que es independiente de la biosíntesis de la hormona (Liu *et al.*, 2015). Nuestros resultados indican que los niveles de auxinas se mantienen invariables por el estrés en ambos genotipos, esto concuerda con lo descrito anteriormente. Aun así, para un estudio más exhaustivo nuestros datos se deberían complementar con la cuantificación de hormonas en el sistema radicular.

Las CKs ejercen un efecto negativo en la tolerancia de las plantas a estrés salino (Yu *et al.*, 2020). La aplicación exógena de CKs favorece la apertura estomática y la transpiración, por lo que se piensa que su transporte desde el órgano productor dominante, las raíces, a la parte aérea es contraproducente para la supervivencia en una situación de estrés salino (Nishiyama *et al.*, 2011). En *Arabidopsis* se ha comprobado que la sobreexpresión de genes partícipes en la síntesis de CKs conlleva fenotipos de sensibilidad a salinidad y sequía (Nishiyama *et al.*, 2011). En el cultivar Moneymaker de tomate se ha comprobado que los niveles de CKs disminuyen drásticamente en la parte aérea tras un tratamiento de salinidad de 100mM (Ghanem *et al.*, 2008). Los niveles de tZ en nuestro estudio se ven sujetos a una alta variabilidad, por lo que no se puede sacar conclusiones claras de su cuantificación, aunque, en líneas generales, no mostraron grandes diferencias entre genotipos o tratamientos.



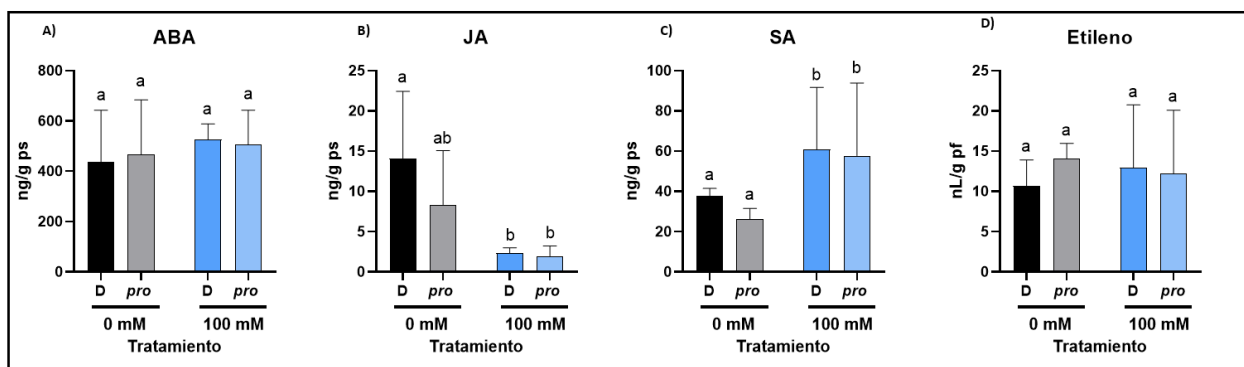
**Figura 9.** Niveles hormonales en plantas D+ (D) y *pro* tratadas con 14 riegos de 0 y 100 mM NaCl. **A-B)** Giberelinas: GA<sub>4</sub> (A) y GA<sub>1</sub> (B). **C)** Auxinas: Ácido indol acético (IAA). **D)** Citoquininas: *trans*-zeatina (tZ). Las barras indican la media con su desviación estándar de 5 muestras por tratamiento y condición. Los niveles de hormonas vienen expresados en ng de compuesto por g de peso seco (ps). Se realizó la prueba ANOVA para los análisis estadísticos. Letras distintas representan  $p < 0.05$ .

#### 4.2.2. Niveles de hormonas de estrés bajo condiciones de salinidad

Las hormonas cuantificadas fueron el ABA y el etileno, como vías de señalización de estrés abiótico principalmente; y JA y SA, como vías de señalización por lo general de estrés biótico. Paradójicamente, los niveles de ABA y etileno no se vieron afectados por genotipo ni tratamiento mientras que los niveles de JA y SA sí que mostraron diferencias, aunque en direcciones opuestas (**Fig. 10**). En el caso de JA, la exposición a sal produjo un descenso significativo en ambos genotipos. Además, *pro* tiende a presentar menores niveles de JA que D+ a 0mM (**Fig. 10B**). Nuestros resultados van en contra de lo descrito por otros autores, los cuales defienden que un estrés salino induce la acumulación de JA que resulta en una disminución del crecimiento de la planta (Abouelsaad y Renault, 2018; Valenzuela *et al.*, 2016).

Por otra parte, las concentraciones de SA aumentan con el tratamiento independientemente de la línea estudiada (**Fig. 10C**). Se piensa que el SA podría ejercer un efecto positivo en la tolerancia a estreses abióticos debido a que promueve la síntesis de enzimas antioxidantes que permiten una mejor adaptación al estrés salino (Senaratna *et al.*, 2000). Estudios realizados en *Arabidopsis* sugieren que es un efecto dependiente de dosis, siendo promotor de tolerancia aplicándolo en concentraciones bajas (50  $\mu$ M), pero contraproducente a altas concentraciones (100  $\mu$ M) (Lee *et al.*, 2010).

Con todo, los resultados indican que los cambios en el estatus hormonal de la planta debidos a un tratamiento de 14 riegos con 100 mM de NaCl son independientes de la actividad de PRO.

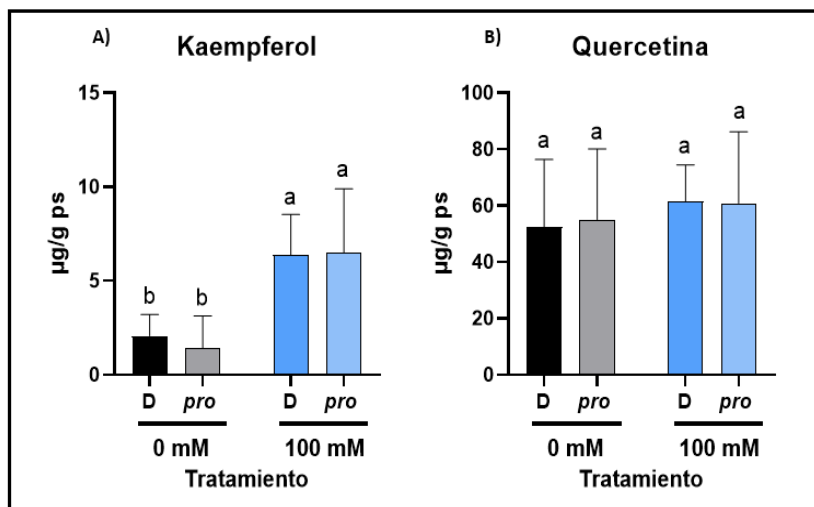


**Figura 10.** Niveles hormonales en plantas D+ (D) y *pro* tratadas con 14 riegos de 0 y 100 mM NaCl II. **A)** ABA, **B)** JA, **C)** SA (ng por g de peso seco) y **D)** etileno (ng por g de peso fresco). Las barras indican la media con su desviación estándar de 5 muestras por tratamiento y condición. Se realizó la prueba ANOVA para los análisis estadísticos. Letras distintas representan  $p < 0.05$ .

### 4.3. Cuantificación de flavonoles

Al cuantificar la acumulación de los flavonoles kaempferol y quercetina (**Fig. 11**) se observó que, mientras que la concentración de quercetina no variaba con genotipo ni tratamiento, la de kaempferol aumentaba en ambas líneas ante el estrés salino. Entre las estrategias que presentan las plantas ante un estrés como el salino se encuentra la producción de flavonoides. Estos actúan como antioxidantes no enzimáticos mitigando el estrés oxidativo causado por los ROS. En tomate se ha descrito que bajo estrés salino la síntesis de flavonoles se ve inhibida en favor de la síntesis de otros flavonoides como los ácidos hidroxicinámicos (Martínez *et al.*, 2016). Nuestros resultados no concuerdan con la literatura. Esto se puede deber a las diferencias metodológicas. Martínez *et al.* utilizó como cultivar de trabajo Boludo y, además, el tratamiento al que expusieron las plantas fue menos severo (80 mM de NaCl 15 días frente a 100 mM durante dos meses).

Nuestros resultados indican por otra parte que la biosíntesis de los flavonoles quercetina y kaempferol es independiente de la actividad de PRO en tomate.



**Figura 11.** Cuantificación de flavonoides en plantas D+ (D) y *pro* tratadas con 14 riegos de 0 y 100mM NaCl. **A)** Kaempferol en µg por g de peso seco (ps). **B)** Quercetina en µg por g de peso seco (ps). Las barras indican la media con su desviación estándar de 5 muestras por tratamiento y condición. Se realizó la prueba ANOVA para los análisis estadísticos. Letras distintas representan  $p < 0.05$ .

#### 4.4. Expresión de genes de defensa

En el experimento de expresión génica se estudiaron los mismos genes que en el experimento de optimización explicado anteriormente. Se aumentó el número de muestras con el objetivo de reducir la dispersión y obtener datos más robustos.

En el caso de *SISOD* y *SIPOD*, ante el estrés se activa la expresión de ambos genes independientemente del genotipo. Esta sobreexpresión es estadísticamente significativa en el caso de *SIPOD* (**Fig. 12**). Por tanto, nuestros resultados sugieren que en tomate la detoxificación de los ROS se da de manera independiente a las DELLAs.

En el caso de los genes implicados en la ruta de señalización por etileno se estudiaron dos genes, *SIER5* y *SIERF1*. En el primer caso, los resultados apuntan a que *pro* sin tratamiento expresa en menor medida el gen que D+ en las mismas condiciones. Sin embargo, estos resultados no son significativos. El tratamiento con 100mM de solución salina no parece afectar a la expresión de este gen independientemente del genotipo (**Fig. 12**). La expresión del gen *SIERF1* en cambio, no se vio influida ni por genotipo ni por tratamiento (**Fig. 12**). De nuestros resultados se podría deducir que, mientras que la regulación de *SIERF1* parece independiente de DELLA, la de *SIER5* sí parece en parte influida por la falta de actividad DELLA.

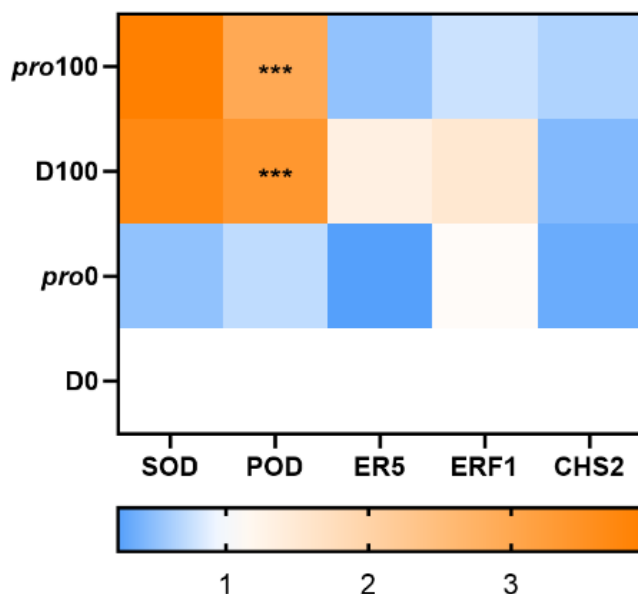
Liu *et al.* realizó un estudio de la expresión de estos y otros genes en MicroTom y una línea mutante de mismo fondo genético con acumulación de DELLAs. En ese caso, la expresión de *SIER5* y



*SIERF1* aumentaba en la línea de sobreexpresión de la DELLA ante salinidad (Liu *et al.*, 2017). Esto indicaba que la expresión de estos genes estaba regulada en alguna medida por las DELLAs. Las discrepancias de nuestros resultados con los de Liu *et al.* pueden deberse a la diferencia de fondo genético. MicroTom presenta una deficiencia en la síntesis de brasinoesteroides de la que la línea MicroTom – DWARF carece. Además, su tratamiento de salinidad exponía a las plantas a un estrés más severo (200mM NaCl en riego) que el nuestro (100 mM NaCl en riego).

En el caso de la *SICH2*, el mutante *pro* parece presentar menores niveles de expresión independientemente del tratamiento con respecto a D+ control. En la línea D+ también se da una posible reducción de la expresión del gen marcador ante tratamiento (**Fig. 12**). Que la línea *pro* exprese en menor medida genes de síntesis de flavonoides concuerda con lo descrito en la literatura en *Arabidopsis* (Li *et al.*, 2014). Sin embargo, nuestros resultados no son significativos. La CHS2 cataliza uno de los primeros pasos en la rutas de biosíntesis de flavonoides, por lo que en futuros experimentos se podría estudiar la expresión génica de otras enzimas aguas abajo en la ruta, las cuales pueden estar sometidas a mecanismos diferentes de regulación.

En resumen, los ensayos de expresión génica dan a entender que solo las enzimas antioxidantes muestran una activación clara ante nuestras condiciones de estrés y que esta activación es independiente de la deficiencia en la actividad DELLA.

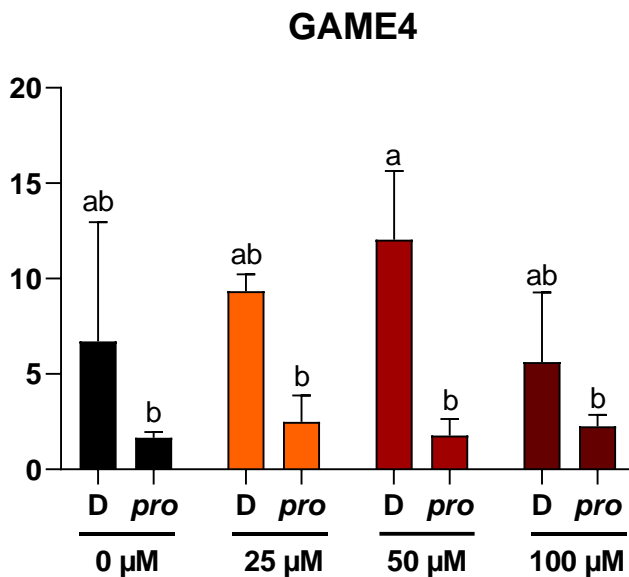


**Figura 12.** Mapa de calor de expresión génica relativa en plantas de tomate D+ (D) y pro tras 14 riegos de 0mM y 100mM NaCl. Todos los datos se han normalizado respecto a los valores de expresión en D0. Se realizó la prueba t para los análisis estadísticos (N=5). \*\*\* representa  $p < 0.001$ .

## 4.5. Ensayos con tratamiento de MeJA

### 4.5.1. Optimización de los ensayos

En primera instancia se realizó un ensayo de 0, 25, 50 y 100  $\mu\text{M}$  MeJA por riego a plantas D+ y *pro* de un mes de edad. Se estudió la expresión de *SIGAME4*, un gen de defensa en respuesta a jasmonatos (ver abajo), observándose diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.001$ ) de comportamiento entre silvestre y *pro* en todas las concentraciones de MeJA ensayadas (**Fig. 13**). Estas diferencias fueron más evidentes a 50  $\mu\text{M}$  MeJA por lo que se utilizó esta concentración en futuros experimentos, donde se aumentó también el número de muestras para obtener resultados más sólidos.



**Figura 13.** Expresión del gen *SIGAME4* en plantas D+ (D) y *pro* de un mes de edad tratadas con un único riego de 0, 25, 50 y 100  $\mu\text{M}$  de MeJA. Las barras representan la media y desviación estándar de 4 réplicas biológicas. Para el análisis de datos se realizó un ANOVA. Letras distintas representa  $p < 0.05$ .

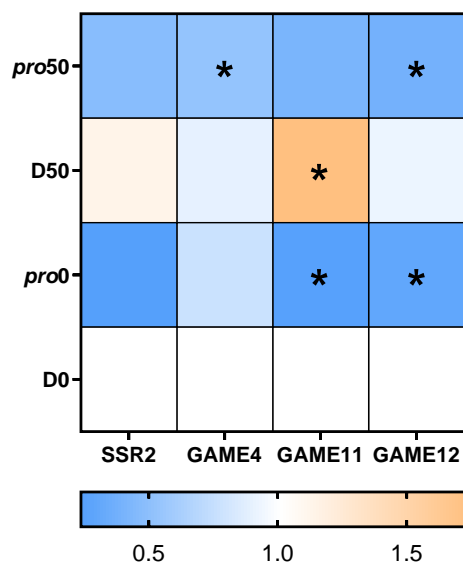
### 4.5.2. Expresión de genes de síntesis de SGAs bajo tratamiento con MeJA

Los niveles de jasmonatos aumentan en respuesta a ataque por patógenos y herbívoros (Wasternack *et al.*, 2006). Por tanto, una forma sencilla de simular estrés biótico en plantas es tratarlas con jasmonatos. Así, para comparar la tolerancia a estrés biótico de plantas D+ y *pro*, se regaron con MeJA y se estudió la expresión de genes de respuesta a las 24 horas. En concreto, se seleccionaron los genes *SISR2*, *SIGAME4*, *SIGAME11* y *SIGAME12*. Estos son genes dentro de la ruta de biosíntesis de SGAs, metabolitos secundarios defensivos de la planta que se suelen acumular ante

un estrés. Se sabe que la expresión de estos genes es dependiente de la señalización por JA en tomate (Montero-Vargas *et al.*, 2018).

En nuestro caso, se observó en que la expresión de este grupo de genes era, en general, más baja en *pro* con respecto a D+, independientemente de que las plantas hubieran sido previamente tratadas con MeJA (**Fig. 14**). De hecho, el tratamiento con 50  $\mu$ M MeJA tuvo poco impacto en los niveles de expresión, al contrario de lo observado en el experimento previo. Solo *SIGAME11* se activaba significativamente en D+ mientras que la expresión de todos los genes seguía siendo baja en *pro*.

Estos resultados sugieren que las DELLAs regulan en parte los genes partícipes en la ruta de biosíntesis de SGAs, bien directamente o bien interaccionando con las proteínas JAZ. Las plantas *pro*, al expresar en menor medida los genes de esta ruta, especialmente *SIGAME11* y *12*, pueden estar acumulando menos SGAs de por sí. Esto las convertiría en plantas más susceptibles a estrés de tipo biótico. Resultados similares han sido publicados recientemente en Pya *et al.*, 2022. Este trabajo muestra que, sin tratamiento, las plantas *pro* expresaban menos estos genes. Sin embargo, con un tratamiento de 100  $\mu$ M de MeJA, la línea silvestre y la *pro* aumentaban la expresión de este grupo de genes de forma similar (Pya *et al.*, 2022).



**Figura 14.** Mapa de calor de expresión génica relativa en plantas de tomate D+ (D) y *pro* tras un riego único con 0 y 50  $\mu$ M de MeJA. Los datos se normalizaron mediante la fracción con respecto a D0. Se realizó la prueba t para los análisis de datos (N=6). \* representa  $p < 0.05$ .

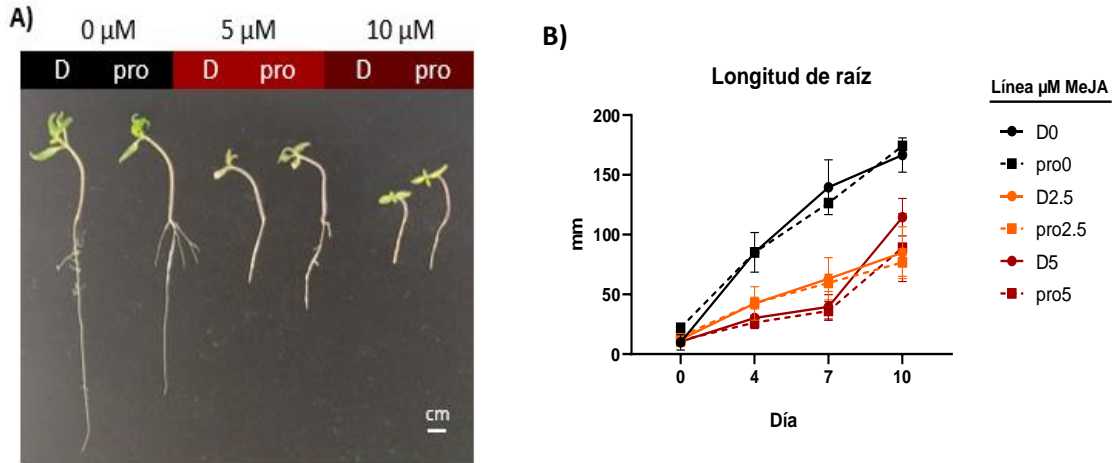
### 4.5.3. Estudio de los efectos inhibidores del MeJA en el crecimiento de la raíz *in vitro*

El balance entre crecimiento y defensa regulado por la interacción DELLA-JAZ se puede estudiar desde ambos enfoques (**Fig. 2**). Anteriormente hemos explicado un ensayo diseñado para estudiar esta interacción con respecto a la defensa (apartado 2.5.2.). Para determinar cómo se ve afectado el crecimiento por la carencia de actividad DELLA hemos realizado un ensayo de sensibilidad a MeJA *in vitro*. El MeJA inhibe el crecimiento debido en parte a la interacción DELLA-JAZ. Se esperaría, por tanto, que *pro* presentara un fenotipo de insensibilidad a MeJA.

En el estudio de crecimiento de plántulas *in vitro* bajo tratamiento con MeJA se realizaron dos experimentos. En un primer lugar se usaron las concentraciones 0, 5, 10, 15 y 25  $\mu\text{M}$ . En este experimento se observó una inhibición similar del crecimiento con el tratamiento de MeJA en ambos genotipos (**Fig. 15A**). A concentraciones 10  $\mu\text{M}$  y superiores la tasa de inhibición de las raíces no variaba por lo que se supuso que se llegó a una situación de saturación (resultados no mostrados). Con esto, se decidió realizar un nuevo experimento con las concentraciones 0, 2.5 y 5  $\mu\text{M}$ . El objetivo de esto fue encontrar una concentración a la que *pro* reaccionase de manera distinta a D+.

En primer lugar, nuestro análisis muestra que, al contrario de lo descrito por ejemplo en *Arabidopsis*, la pérdida de función DELLA no generaba raíces más largas en condiciones control. Es más, el tratamiento con MeJA inhibió el desarrollo radicular de forma similar en plántulas D+ y *pro*. Esta inhibición fue dependiente de dosis a los 4 y 7 días tras el inicio del tratamiento. Sin embargo, a día 10 las plántulas tratadas con 5  $\mu\text{M}$  MeJA eran ligeramente más largas que las tratadas con 2.5  $\mu\text{M}$  MeJA (**Fig. 14B**).

En resumen, a ninguna de las concentraciones ensayadas se observó una respuesta dependiente de genotipo. Esto sugiere que la ausencia de actividad DELLA no influye a estas concentraciones en el efecto inhibitorio del MeJA sobre el crecimiento de la radícula de D+. De hecho, como se ha comentado, el mutante *pro* tampoco desarrolla raíces más largas en condiciones control lo que indica que el papel de las DELLA es menor en el desarrollo de la raíz de tomate, al menos en los primeros 10 días tras germinación.



**Figura 15.** Ensayo de crecimiento *in vitro* de plántulas en presencia de MeJA. **A)** De izquierda a derecha. Plántulas crecidas 10 días de D+ (D) y *pro* en medio  $\text{MS}\frac{1}{2}$  a 0, 5 y 10  $\mu\text{M}$  de MeJA respectivamente. **B)** Longitud media de la raíz de plántulas D y *pro* tras 0, 4, 7 y 10 días en 0, 2.5 y 5  $\mu\text{M}$  MeJA. Se representan las medias (N entre 8 y 12). Se aplicó la prueba ANOVA para el análisis de datos, letras diferentes corresponde a diferencias significativas ( $p < 0.05$ ).

## 5. Discusión

Debido al crecimiento exponencial de la población, la Comisión Europea instauró un plan de desarrollo sostenible de las técnicas agrarias. Entre las estrategias propuestas se encuentra el desarrollo de cultivos más productivos y resilientes a estrés. La ruta de señalización GAs-DELLAs tiene un gran potencial para este desarrollo. Las DELLAs participan en varios procesos biológicos de la planta, esto las hace un punto de modificación de gran interés y, a la vez, complicado ya que cualquier cambio en su actividad puede producir efectos pleiotrópicos. Las nuevas técnicas de edición génica junto al amplio conocimiento de esta ruta que hoy se tiene permiten modificaciones más precisas. Uno de los aspectos que se pretenden modificar es el balance crecimiento-defensa de las plantas basado en parte en la interacción DELLA-JAZ. Estudios recientes han demostrado que un desacoplamiento de ambas respuestas es posible (Campos *et al.*, 2016; Zhang *et al.*, 2020). Con este objetivo, nuestro grupo está trabajando en el diseño de alelos arísticos de las DELLAs que desacoplen el freno del crecimiento del establecimiento de las respuestas defensivas. Nuevas variantes DELLA se están ensayando ya en *Arabidopsis* con resultados óptimos (resultados no publicados).

El siguiente paso es ensayar estos alelos en un cultivo. Se eligió el tomate debido a que es un cultivo extendido a nivel mundial y de gran interés económico. En el IBMCP es un sistema conocido, con gran tradición, habiendo en el instituto grupos líder en el campo. Su genoma está secuenciado (Sato *et al.*, 2012), presenta una única proteína DELLA, PRO (Bassel *et al.*, 2008; Carrera *et al.*, 2012) y existen protocolos eficientes de transformación (McCormick, 1991) y edición por CRISPR/Cas9 (Chyrasekaran *et al.*, 2021).

El objetivo del proyecto es transformar el mutante de pérdida de función *pro* de tomate con los alelos DELLA más prometedores y analizar su actividad en condiciones control y bajo estrés biótico y abiótico. Pero para ello antes debemos caracterizar el comportamiento en crecimiento y defensa del mutante *pro*, poner a punto ensayos de estrés y encontrar las condiciones óptimas donde observar un comportamiento diferencial entre mutantes *pro* y plantas silvestres.

El mutante *pro* presenta un fenotipo de señalización constitutiva por GAs, dando plantas más altas y partenocárpicas que producen más frutos y con mayor dulzor. Esto es de interés para la producción de alimentos procesados como sopas o salsas. Sin embargo, este mutante también presenta características no deseadas agrónomicamente como un menor peso de los frutos y tallos más débiles

(Carrera *et al.*, 2012). Ya se han desarrollado variantes alélicas *pro* que corrigen parte de estas características (Shinozaki *et al.*, 2018).

Con respecto al estrés salino, en *Arabidopsis* la pérdida de función DELLA resulta en fenotipos de hipersensibilidad. Teniendo en cuenta que la función DELLA está muy conservada en plantas vasculares (Hernández-García *et al.*, 2021), el mutante *pro* debería ser más sensible a este estrés, pero esto no se ha comprobado.

En trabajos previos del grupo se ha comprobado que ante estrés de 150 y 200 mM de NaCl las plantas no sobrevivían (resultados no publicados). En nuestro trabajo se muestra, que, a nivel molecular, la planta no se ve afectada a 50 mM NaCl mientras que a 100mM NaCl se activan los marcadores de estrés. Aun así, a 100 mM NaCl la planta sigue creciendo y produciendo frutos. Por tanto, consideramos que estas eran las condiciones óptimas para analizar las respuestas de *pro* a estrés salino.

A nivel de desarrollo inflorescente los datos obtenidos en condiciones control se rigen a lo descrito en trabajos previos (Carrera *et al.*, 2012). Respecto al silvestre, el crecimiento de la inflorescencia de *pro* sí se ve más afectado en condiciones de salinidad. Sin embargo, silvestre y *pro* mostraron un descenso similar en la productividad en condiciones de estrés salino y, de hecho, *pro* seguía produciendo más frutos que el silvestre en estas condiciones, aunque más pequeños.

A nivel molecular, *pro* y silvestre presentan un comportamiento similar en el estatus hormonal, la concentración de flavonoles y la expresión de genes de defensa. Los niveles de JA descienden con el tratamiento de salinidad en ambos genotipos, esto podría sugerir un aumento de la susceptibilidad a estreses bióticos.

En resumen, *pro* no parece ser más sensible al estrés salino. Es un resultado inesperado, en *Arabidopsis* las DELLA favorecen la tolerancia a sal a través de la activación de mecanismos detoxificantes de ROS (Achard *et al.*, 2006, 2008) entre otros y con la interacción con otras vías de señalización hormonal como el ABA (Steber *et al.*, 2013). Una posible explicación a nuestros resultados es que durante la domesticación del tomate se hayan seleccionado caracteres independientes de DELLA que proporcionen tolerancia a sal. Serán necesarios estudios más exhaustivos para completar este trabajo.

Con lo que respecta al estrés biótico, se sabe que en *Arabidopsis* las DELLA promueven la defensa contra patógenos (Achard *et al.*, 2008). En tomate no se han realizado estudios relevantes.

Realizamos una primera aproximación a este campo mediante tratamiento con MeJA. El MeJA es una de las hormonas de la familia de los jasmonatos, características de la señalización del estrés biótico. Los ensayos *in vitro* son poco informativos. Los resultados apuntan a que *pro* no afecta al desarrollo de la raíz en plántulas de tomate, algo ya descrito por Carrera *et al.* 2010. En lo relativo a ensayos de expresión de genes de defensa, un reciente artículo demuestra que no hay diferencias en su activación entre el silvestre y *pro* tras un tratamiento de 100  $\mu\text{M}$  de MeJA (Pya *et al.*, 2022). Una posible explicación es que a esta concentración el sistema de doble inhibición se vea saturado, y las altas concentraciones de JA induzcan la respuesta independientemente de JAZ. En este trabajo probamos el mismo tratamiento y otros con concentraciones más bajas (25 y 50  $\mu\text{M}$ ). Con ello seleccionamos la concentración de resultados más prometedores (50  $\mu\text{M}$ ) y realizamos un ensayo de expresión génica donde se ven claras diferencias entre *pro* y el silvestre. Este ensayo muestra que, probablemente, *pro* sea más sensible a estrés biótico ya que, respecto al silvestre, muestra niveles sensiblemente más bajos de expresión de genes de biosíntesis de metabolitos protectores frente a patógenos y herbívoros ya sea en las condiciones control o bajo tratamiento con MeJA. Estos resultados indicarían que, al contrario de lo observado en los ensayos de sal, *pro* sí es más sensible a estrés biótico. En siguientes experimentos, se confirmará esta posibilidad mediante, por ejemplo, infección con patógenos. Asimismo, será esencial traspasar y ampliar estos ensayos a variedades comerciales de tomate como M82.



## 6. Conclusiones

Se han puesto a punto ensayos de salinidad y MeJA con los que estudiar el papel de las DELLA en el crecimiento y la defensa en tomate. *pro* no parece ser más susceptible al estrés salino moderado; sin embargo, podría ser más susceptible al estrés biótico ya que muestra niveles de expresión más bajos de genes de defensa en respuesta a MeJA.

Aparte de los mecanismos de defensa, hay otros caracteres agronómicos que mejorar en *pro* como, por ejemplo, la productividad.

## **7. Agradecimientos**

Agradezco a mis tutores, Esther Carrera y Antonio Serrano, la ayuda, la comprensión y el apoyo aportados estos meses.

Agradezco a mis padres el aguantar tenerme lejos desde hace ya seis años. Por toda la ayuda que me han dado siempre.

Y por último, agradezco a mi hermano que me haya defendido siempre y nunca haya dejado que me crea menos de lo que soy.

## 8. Bibliografía

- Abouelsaad, I., y Renault, S. (2018). Enhanced oxidative stress in the jasmonic acid-deficient tomato mutant def-1 exposed to NaCl stress. *Journal of Plant Physiology*, 226(April), 136-144. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2018.04.009>
- Achard, P., Cheng, H., De Grauwe, L., Decat, J., Schoutteten, H., Moritz, T., Van Der Straeten, D., Peng, J., y Harberd, N. P. (2006). Integration of plant responses to environmentally activated phytohormonal signals. *Science*, 311(5757), 91-94. <https://doi.org/10.1126/science.1118642>
- Achard, P., Renou, J. P., Berthomé, R., Harberd, N. P., y Genschik, P. (2008). Plant DELLAs Restrain Growth y Promote Survival of Adversity by Reducing the Levels of Reactive Oxygen Species. *Current Biology*, 18(9), 656-660. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2008.04.034>
- Ahiakpa, J. K., Karikari, B., Magdy, M., Munir, S., Mumtaz, M. A., Li, F., Wang, Y., Shang, L., Zhang, Y., Ahiakpa, J. K., Karikari, B., Magdy, M., Munir, S., Mumtaz, M. A., Li, F., Wang, Y., Shang, L., y Zhang, Y. (2021). Regulation of invertase y sucrose for improving tomato fruit flavor: A review. *Vegetable Research 2021 1:1*, 1(1), 1-13. <https://doi.org/10.48130/VR-2021-0010>
- Arnaud, N., Girin, T., Sorefan, K., Fuentes, S., Wood, T. A., Lawrenson, T., Sablowski, R., y Østergaard, L. (2010). Gibberellins control fruit patterning in Arabidopsis thaliana. *Genes y Development*, 24(19), 2127. <https://doi.org/10.1101/GAD.593410>
- Bassel, G. W., Mullen, R. T., y Bewley, J. D. (2008). procera is a putative DELLA mutant in tomato (*Solanum lycopersicum*): effects on the seed y vegetative plant. *Journal of Experimental Botany*, 59(3), 585-593. <https://doi.org/10.1093/JXB/ERM354>
- Bolle, C. (2004). The role of GRAS proteins in plant signal transduction y development. *Planta*, 218(5), 683-692. <https://doi.org/10.1007/s00425-004-1203-z>
- Campos, M. L., Yoshida, Y., Major, I. T., De Oliveira Ferreira, D., Weraduwage, S. M., Froehlich, J. E., Johnson, B. F., Kramer, D. M., Jyer, G., Sharkey, T. D., y Howe, G. A. (2016). Rewiring of jasmonate y phytochrome B signalling uncouples plant growth-defense

- tradeoffs. *Nature Communications*, 7. <https://doi.org/10.1038/ncomms12570>
- Carrera, E., Ruiz-Rivero, O., Peres, L. E. P., Atares, A., y Garcia-Martinez, J. L. (2012). Characterization of the procerato tomato mutant shows novel functions of the SIDEELLA protein in the control of flower morphology, cell division y expansion, y the auxin-signaling pathway during fruit-set y development. *Plant Physiology*, 160(3), 1581-1596. <https://doi.org/10.1104/pp.112.204552>
- Chyrasekaran, M., Boopathi, T., y Paramasivan, M. (2021). A status-quo review on CRISPR-Cas9 gene editing applications in tomato. *International Journal of Biological Macromolecules*, 190, 120-129. <https://doi.org/10.1016/J.IJBIOMAC.2021.08.169>
- Chaudhry, U. K., Gökçe, Z. N. Ö., y Gökçe, A. F. (2022). Salt Responses y Plant Molecular Responses. *Plant Defense Mechanisms*.
- Chauhan, N., Sharma, J. B., Rana, K., y Mir, W. (2020). *Effects of gibberellins y Promalin on the growth y development of fruit crops : A review*. 9(6), 1284-1289.
- Choudhury, F. K., Rivero, R. M., Blumwald, E., y Mittler, R. (2017). Reactive oxygen species, abiotic stress y stress combination. *The Plant journal : for cell y molecular biology*, 90(5), 856-867. <https://doi.org/10.1111/TPJ.13299>
- Creelman, R. A., y Mullet, J. E. (2003). BIOSYNTHESIS Y ACTION OF JASMONATES IN PLANTS. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.arplant.48.1.355>, 48, 355-381. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV.ARPLANT.48.1.355>
- Davière, J. M., y Achard, P. (2013). Gibberellin signaling in plants. *Development (Cambridge)*, 140(6), 1147-1151. <https://doi.org/10.1242/dev.087650>
- De Lucas, M., Davière, J. M., Rodríguez-Falcón, M., Pontin, M., Iglesias-Pedraz, J. M., Lorrain, S., Fankhauser, C., Blázquez, M. A., Titarenko, E., y Prat, S. (2008). A molecular framework for light y gibberellin control of cell elongation. *Nature*, 451(7177), 480-484. <https://doi.org/10.1038/nature06520>
- Europea, C. (2021). *Farm to Fork Strategy*. [https://ec.europa.eu/food/horizontal-topics/farm-fork-strategy\\_en](https://ec.europa.eu/food/horizontal-topics/farm-fork-strategy_en)

FAOSTAT. (2022). *FAOSTAT*. <https://www.fao.org/faostat/en/#home>

Fukao, T., Xu, K., Ronald, P. C., y Bailey-Serres, J. (2006). A variable cluster of ethylene response factor-like genes regulates metabolic y developmental acclimation responses to submergence in rice. *The Plant cell*, 18(8), 2021-2034.  
<https://doi.org/10.1105/TPC.106.043000>

Gao y Chu. (2020). *Page 31 of 62 Plant y Cell Physiology*.

Ghanem, M. E., Albacete, A., Martínez-Yújar, C., Acosta, M., Romero-Arya, R., Dodd, I. C., Lutts, S., y Pérez-Alfocea, F. (2008). Hormonal changes during salinity-induced leaf senescence in tomato (*Solanum lycopersicum* L.). *Journal of Experimental Botany*, 59(11), 3039-3050. <https://doi.org/10.1093/JXB/ERN153>

Gong, Z., Xiong, L., Shi, H., Yang, S., Herrera-Estrella, L. R., Xu, G., Chao, D. Y., Li, J., Wang, P. Y., Qin, F., Li, J., Ding, Y., Shi, Y., Wang, Y., Yang, Y., Guo, Y., y Zhu, J. K. (2020). Plant abiotic stress response y nutrient use efficiency. *Science China Life Sciences*, 63(5), 635-674. <https://doi.org/10.1007/s11427-020-1683-x>

Hedden, P. (2020). The current status of research on gibberellin biosynthesis. *Plant y Cell Physiology*, 61(11), 1832-1849. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcaa092>

Hernández-García, J., Briones-Moreno, A., y Blázquez, M. A. (2021). Origin y evolution of gibberellin signaling y metabolism in plants. *Seminars in Cell y Developmental Biology*, 109, 46-54. <https://doi.org/10.1016/J.SEMCDB.2020.04.009>

Hirano, K., Kouketu, E., Katoh, H., Aya, K., Ueguchi-Tanaka, M., y Matsuoka, M. (2012). The suppressive function of the rice DELLA protein SLR1 is dependent on its transcriptional activation activity. *The Plant journal : for cell y molecular biology*, 71(3), 443-453.  
<https://doi.org/10.1111/J.1365-313X.2012.05000.X>

Hong, G. J., Xue, X. Y., Mao, Y. B., Wang, L. J., y Chen, X. Y. (2012). Arabidopsis MYC2 interacts with DELLA proteins in regulating sesquiterpene synthase gene expression. *Plant Cell*, 24(6), 2635-2648. <https://doi.org/10.1105/TPC.112.098749/DC1>

Hou, X., Lee, L. Y. C., Xia, K., Yan, Y., y Yu, H. (2010). DELLAs Modulate Jasmonate Signaling via Competitive Binding to JAZs. *Developmental Cell*, 19(6), 884-894.

<https://doi.org/10.1016/J.DEVCEL.2010.10.024>

Huot, B., Yao, J., Montgomery, B. L., y He, S. Y. (2014). Growth-defense tradeoffs in plants: A balancing act to optimize fitness. *Molecular Plant*, 7(8), 1267-1287.

<https://doi.org/10.1093/mp/ssu049>

Iglesias, M. J., Terrile, M. C., Bartoli, C. G., D'Ippólito, S., y Casalengué, C. A. (2010). Auxin signaling participates in the adaptative response against oxidative stress y salinity by interacting with redox metabolism in Arabidopsis. *Plant Molecular Biology*, 74(3), 215-222.

<https://doi.org/10.1007/S11103-010-9667-7/FIGURES/5>

Jimenez-Aleman, G. H., Machado, R. A. R., Baldwin, I. T., y Boly, W. (2017). JA-Ile-macrolactones uncouple growth y defense in wild tobacco. *Organic y Biomolecular Chemistry*, 15(16), 3391-3395. <https://doi.org/10.1039/C7OB00249A>

Klay, I., Gouia, S., Liu, M., Mila, I., Khoudi, H., Bernadac, A., Bouzayen, M., y Pirrello, J. (2018). Ethylene Response Factors (ERF) are differentially regulated by different abiotic stress types in tomato plants. *Plant Science*, 274, 137-145.

Lee, S., Kim, S. G., y Park, C. M. (2010). Salicylic acid promotes seed germination under high salinity by modulating antioxidant activity in Arabidopsis. *New Phytologist*, 188(2), 626-637. <https://doi.org/10.1111/J.1469-8137.2010.03378.X>

Li, Y., Van Den Ende, W., y Rolly, F. (2014). Sucrose Induction of Anthocyanin Biosynthesis Is Mediated by DELLA. *Molecular Plant*, 7(3), 570-572. <https://doi.org/10.1093/MP/SST161>

Liu, Q., Guo, X., Chen, G., Zhu, Z., Yin, W., y Hu, Z. (2016). Silencing SIGID2, a putative F-box protein gene, generates a dwarf plant y dark-green leaves in tomato. *Plant Physiology y Biochemistry*, 109, 491-501. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2016.10.030>

Liu, W., Li, R. J., Han, T. T., Cai, W., Fu, Z. W., y Lu, Y. T. (2015). Salt stress reduces root meristem size by nitric oxidemediated modulation of auxin accumulation y signaling in Arabidopsis. *Plant Physiology*, 168(1), 343-356. <https://doi.org/10.1104/pp.15.00030>

Liu, Y., Huang, W., Xian, Z., Hu, N., Lin, D., Ren, H., Chen, J., Su, D., y Li, Z. (2017). Overexpression of SLGRAS40 in tomato enhances tolerance to abiotic stresses y influences auxin y gibberellin signaling. *Frontiers in Plant Science*, 8(September), 1-17.

<https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01659>

Machado, R. A. R., Baldwin, I. T., y Erb, M. (2017). Herbivory-induced jasmonates constrain plant sugar accumulation y growth by antagonizing gibberellin signaling y not by promoting secondary metabolite production. *New Phytologist*, 215(2), 803-812.

<https://doi.org/10.1111/nph.14597>

Martinez, V., Mestre, T. C., Rubio, F., Girones-Vilaplana, A., Moreno, D. A., Mittler, R., y Rivero, R. M. (2016). Accumulation of flavonols over hydroxycinnamic acids favors oxidative damage protection under abiotic stress. *Frontiers in Plant Science*, 7(JUNE2016), 1-17. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00838>

McCormick, S. (1991). Transformation of tomato with *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Tissue Culture Manual*, 311-319.

[https://doi.org/10.1007/978-94-009-0103-2\\_17](https://doi.org/10.1007/978-94-009-0103-2_17)

Mittova, V., Volokita, M., Guy, M., y Tal, M. (2000). Activities of SOD y the ascorbate-glutathione cycle enzymes in subcellular compartments in leaves y roots of the cultivated tomato y its wild salt-tolerant relative *Lycopersicon pennellii*. *Physiologia Plantarum*, 110(1), 42-51. <https://doi.org/10.1034/J.1399-3054.2000.110106.X>

Monna, L., Kitazawa, N., Yoshino, R., Suzuki, J., Masuda, H., Maehara, Y., Tanji, M., Sato, M., Nasu, S., y Minobe, Y. (2002). Positional cloning of rice semidwarfing gene, sd-1: Rice «green revolution gene» encodes a mutant enzyme involved in gibberellin synthesis. *DNA Research*, 9(1), 11-17. <https://doi.org/10.1093/dnares/9.1.11>

Montero-Vargas, J. M., Casarrubias-Castillo, K., Martínez-Gallardo, N., Ordaz-Ortiz, J. J., Délano-Frier, J. P., y Winkler, R. (2018). Modulation of steroidal glycoalkaloid biosynthesis in tomato (*Solanum lycopersicum*) by jasmonic acid. *Plant Science*, 277, 155-165.

<https://doi.org/10.1016/J.PLANTSCI.2018.08.020>

Munns, R., y Tester, M. (2008). Mechanisms of Salinity Tolerance.

<http://dx.doi.org/10.1146/annurev.arplant.59.032607.092911>, 59, 651-681.

<https://doi.org/10.1146/ANNUREV.ARPLANT.59.032607.092911>

Nir, I., Shohat, H., Panizel, I., Olszewski, N., Aharoni, A., y Weiss, D. (2018). The Tomato

DELLA Protein PROCERA Acts in Guard Cells to Promote Stomatal Closure. *The Plant Cell*, 29(12), 3186-3197. <https://doi.org/10.1105/TPC.17.00542>

Nishiyama, R., Watanabe, Y., Fujita, Y., Le, D. T., Kojima, M., Werner, T., Vankova, R., Yamaguchi-Shinozaki, K., Shinozaki, K., Kakimoto, T., Sakakibara, H., Schmölling, T., y Tran, L. S. P. (2011). Analysis of Cytokinin Mutants y Regulation of Cytokinin Metabolic Genes Reveals Important Regulatory Roles of Cytokinins in Drought, Salt y Abscisic Acid Responses, y Abscisic Acid Biosynthesis. *The Plant Cell*, 23(6), 2169-2183.

<https://doi.org/10.1105/TPC.111.087395>

Pyra, S., Jozwiak, A., Sonawane, P. D., Szymanski, J., Kazachkova, Y., Vainer, A., Vasuki Kilambi, H., Almekias-Siegl, E., Dikaya, V., Bocobza, S., Shohat, H., Meir, S., Wizler, G., Giri, A. P., Schuurink, R., Weiss, D., Yasuor, H., Kamble, A., y Aharoni, A. (2022). Steroidal alkaloids defence metabolism y plant growth are modulated by the joint action of gibberellin y jasmonate signalling. *New Phytologist*, 233(3), 1220-1237.

<https://doi.org/10.1111/nph.17845>

Peng, Jinrong, Carol, P., Richards, D. E., King, K. E., Cowling, R. J., Murphy, G. P., y Harberd, N. P. (1997). The Arabidopsis GAI gene defines a signaling pathway that negatively regulates gibberellin responses. *Genes y Development*, 11(23), 3194.

<https://doi.org/10.1101/GAD.11.23.3194>

Peng, Jinrong, y Harberd, N. P. (1997). Gibberellin Deficiency y Response Mutations Suppress the Stem Elongation Phenotype of Phytochrome-Deficient Mutants of Arabidopsis. *Plant Physiology*, 113(4), 1051-1058. <https://doi.org/10.1104/PP.113.4.1051>

Peng, Jinrong, Richards, D. E., Hartley, N. M., Murphy, G. P., Devos, K. M., Flintham, J. E., Pelica, F., Sudhakar, D., Christou, P., Centre, J. I., Lane, C., y Nr, N. (1999). 22307. *400*(July), 8-13.

Peng, Jinying, Li, Z., Wen, X., Li, W., Shi, H., Yang, L., Zhu, H., y Guo, H. (2014). Salt-Induced Stabilization of EIN3/EIL1 Confers Salinity Tolerance by Deterring ROS Accumulation in Arabidopsis. *PLOS Genetics*, 10(10), e1004664.

<https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PGEN.1004664>

Qi, T., Song, S., Ren, Q., Wu, D., Huang, H., Chen, Y., Fan, M., Peng, W., Ren, C., y Xie, D.



- (2011). The Jasmonate-ZIM-Domain Proteins Interact with the WD-Repeat/bHLH/MYB Complexes to Regulate Jasmonate-Mediated Anthocyanin Accumulation y Trichome Initiation in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Cell*, 23(5), 1795-1814.  
<https://doi.org/10.1105/TPC.111.083261>
- Quinet, M., Angosto, T., Yuste-Lisbona, F. J., Blanchard-Gros, R., Bigot, S., Martinez, J. P., y Lutts, S. (2019). Tomato Fruit Development y Metabolism. *Frontiers in Plant Science*, 10, 1554. <https://doi.org/10.3389/FPLS.2019.01554/BIBTEX>
- Saito, T., Matsukura, C., Saito, T., y Matsukura, C. (2015). Effect of Salt Stress on the Growth y Fruit Quality of Tomato Plants. *Abiotic Stress Biology in Horticultural Plants*, 3-16.  
[https://doi.org/10.1007/978-4-431-55251-2\\_1](https://doi.org/10.1007/978-4-431-55251-2_1)
- Sato, S., Tabata, S., Hirakawa, H., Asamizu, E., Shirasawa, K., Isobe, S., Kaneko, T., Nakamura, Y., Shibata, D., Aoki, K., Egholm, M., Knight, J., Bogden, R., Li, C., Shuang, Y., Xu, X., Pan, S., Cheng, S., Liu, X., ... Gianese, G. (2012). The tomato genome sequence provides insights into fleshy fruit evolution. *Nature*, 485(7400), 635.  
<https://doi.org/10.1038/NATURE11119>
- Senaratna, T., Touchell, D., Bunn, E., y Dixon, K. (2000). Acetyl salicylic acid (Aspirin) y salicylic acid induce multiple stress tolerance in bean y tomato plants. *Plant Growth Regulation* 2000 30:2, 30(2), 157-161. <https://doi.org/10.1023/A:1006386800974>
- Shinozaki, Y., Ezura, K., Hu, J., Okabe, Y., Bénard, C., Prodhomme, D., Gibon, Y., Sun, T. ping, Ezura, H., y Ariizumi, T. (2018). Identification y functional study of a mild allele of SIDELLA gene conferring the potential for improved yield in tomato. *Scientific Reports*, 8(1), 1-15. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-30502-w>
- Shohat, H., Eliaz, N. I., y Weiss, D. (2021). Gibberellin in tomato: metabolism, signaling y role in drought responses. *Molecular Horticulture*, 1(1), 1-12. <https://doi.org/10.1186/s43897-021-00019-4>
- Song, S., Qi, T., Wasternack, C., y Xie, D. (2014). Jasmonate signaling y crosstalk with gibberellin y ethylene. *Current Opinion in Plant Biology*, 21, 112-119.  
<https://doi.org/10.1016/J.PBI.2014.07.005>

- Steber, C. M., Ariizumi, T., Hauvermale, A. L., Nelson, S. K., Hanada, A., y Yamaguchi, S. (2013). Lifting DELLA Repression of Arabidopsis Seed Germination by Nonproteolytic Gibberellin Signaling. *Plant Physiology*, 162(4), 2125-2139.  
<https://doi.org/10.1104/PP.113.219451>
- Tan, H., Man, C., Xie, Y., Yan, J., Chu, J., y Huang, J. (2019). A Crucial Role of GA-Regulated Flavonol Biosynthesis in Root Growth of Arabidopsis. *Molecular Plant*, 12(4), 521-537.  
<https://doi.org/10.1016/J.MOLP.2018.12.021>
- Thomas, S. G., Blázquez, M. A., y Alabadí, D. (2016). DELLA Proteins: Master Regulators of Gibberellin-Responsive Growth y Development. En *Annual Plant Reviews: The Gibberellins* (Vol. 49). <https://doi.org/10.1002/9781119210436.ch7>
- Ueguchi-Tanaka, M., Ashikari, M., Nakajima, M., Itoh, H., Katoh, E., Kobayashi, M., Chow, T. Y., Hsing, Y. I. C., Kitano, H., Yamaguchi, I., y Matsuoka, M. (2005). GIBBERELLIN INSENSITIVE DWARF1 encodes a soluble receptor for gibberellin. *Nature*, 437(7059), 693-698. <https://doi.org/10.1038/nature04028>
- Valenzuela, C. E., Acevedo-Acevedo, O., Mirya, G. S., Vergara-Barros, P., Holuigue, L., Figueroa, C. R., y Figueroa, P. M. (2016). Salt stress response triggers activation of the jasmonate signaling pathway leading to inhibition of cell elongation in Arabidopsis primary root. *Journal of Experimental Botany*, 67(14), 4209-4220.  
<https://doi.org/10.1093/JXB/ERW202>
- Van De Velde, K., Ruelens, P., Geuten, K., Rohde, A., y Van Der Straeten, D. (2017). Exploiting DELLA Signaling in Cereals. *Trends in Plant Science*, 22(10), 880-893.  
<https://doi.org/10.1016/J.TPLANTS.2017.07.010>
- Wani, S. H., Kumar, V., Shriram, V., y Sah, S. K. (2016). Phytohormones y their metabolic engineering for abiotic stress tolerance in crop plants. *Crop Journal*, 4(3), 162-176.  
<https://doi.org/10.1016/j.cj.2016.01.010>
- Wasternack, C., Stenzel, I., Hause, B., Hause, G., Kutter, C., Maucher, H., Neumerkel, J., Feussner, I., y Miersch, O. (2006). The wound response in tomato - Role of jasmonic acid. *Journal of Plant Physiology*, 163, 297-306. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2005.10.014>

- Xie, Y., Tan, H., Ma, Z., y Huang, J. (2016). DELLA Proteins Promote Anthocyanin Biosynthesis via Sequestering MYBL2 y JAZ Suppressors of the MYB/bHLH/WD40 Complex in *Arabidopsis thaliana*. *Molecular Plant*, 9(5), 711-721.  
<https://doi.org/10.1016/J.MOLP.2016.01.014>
- Yang, Y., y Guo, Y. (2018). Elucidating the molecular mechanisms mediating plant salt-stress responses. *New Phytologist*, 217(2), 523-539. <https://doi.org/10.1111/nph.14920>
- Yin, Y. G., Kobayashi, Y., Sanuki, A., Kondo, S., Fukuda, N., Ezura, H., Sugaya, S., y Matsukura, C. (2010). Salinity induces carbohydrate accumulation y sugar-regulated starch biosynthetic genes in tomato (*Solanum lycopersicum* L. cv. 'Micro-Tom') fruits in an ABA-y osmotic stress-independent manner. *Journal of experimental botany*, 61(2), 563-574.  
<https://doi.org/10.1093/JXB/ERP333>
- Yu, Z., Duan, X., Luo, L., Dai, S., Ding, Z., y Xia, G. (2020). How Plant Hormones Mediate Salt Stress Responses. *Trends in Plant Science*, 25(11), 1117-1130.  
<https://doi.org/10.1016/j.tplants.2020.06.008>
- Zhang, H., Zhao, Y., y Zhu, J. K. (2020). Thriving under Stress: How Plants Balance Growth y the Stress Response. *Developmental Cell*, 55(5), 529-543.  
<https://doi.org/10.1016/j.devcel.2020.10.012>
- Zheng, J., Ma, X., Zhang, X., Hu, Q., y Qian, R. (2018). Salicylic acid promotes plant growth y salt-related gene expression in *Dianthus superbus* L. (Caryophyllaceae) grown under different salt stress conditions. *Physiology y Molecular Biology of Plants*, 24(2), 231-238.  
<https://doi.org/10.1007/S12298-017-0496-X/FIGURES/3>
- Zhu, Z., An, F., Feng, Y., Li, P., Xue, L., A, M., Jiang, Z., Kim, J. M., To, T. K., Li, W., Zhang, X., Yu, Q., Dong, Z., Chen, W. Q., Seki, M., Zhou, J. M., y Guo, H. (2011). Derepression of ethylene-stabilized transcription factors (EIN3/EIL1) mediates jasmonate y ethylene signaling synergy in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(30), 12539-12544.  
<https://doi.org/10.1073/PNAS.1103959108/-/DCSUPPLEMENTAL>