



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

Instituto Universitario Mixto de Biología Molecular y Celular de Plantas

Identificación de genes relacionados con la tolerancia a
estreses abióticos mediante mutagénesis insercional de
tomate y especies silvestres relacionadas

Trabajo Fin de Máster

Máster Universitario en Biotecnología Molecular y Celular de
Plantas

AUTOR/A: Sánchez Atrián, Gabriel

Tutor/a: Atarés Huerta, Alejandro

Cotutor/a: Moreno Ferrero, Vicente

Director/a Experimental: Aguiar Domínguez, Alberto

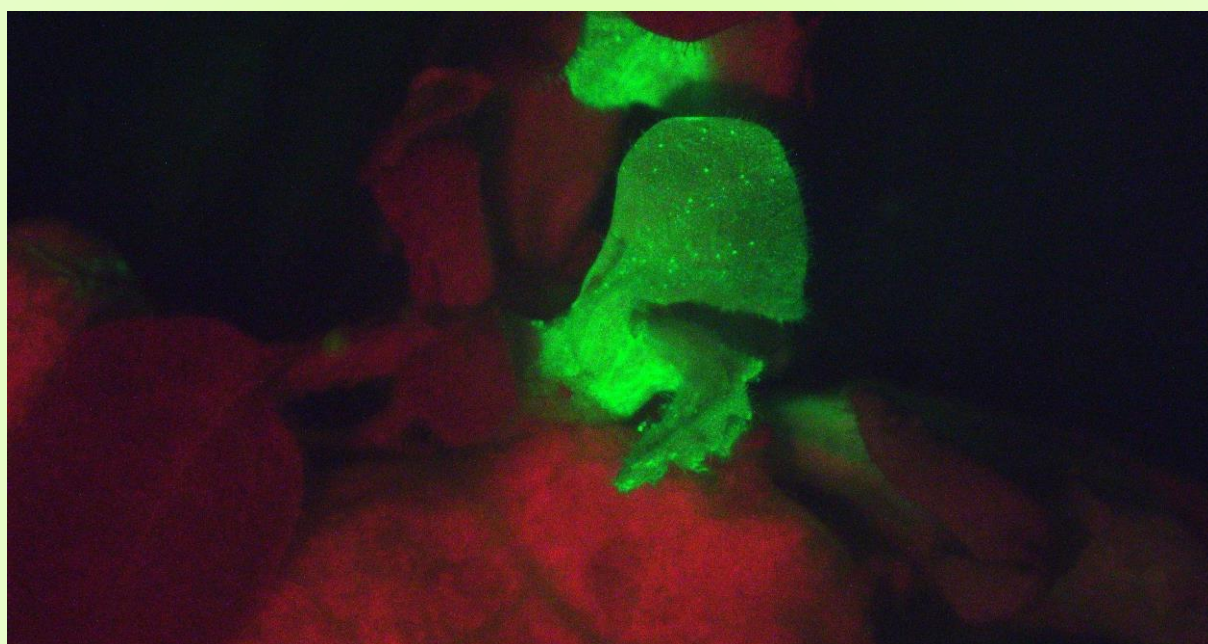
CURSO ACADÉMICO: 2024/2025



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA



Identificación de genes relacionados con la tolerancia a estreses abióticos mediante mutagénesis insercional de tomate y especies silvestres



Gabriel Sánchez Atrián

Enero 2025

Dr. Vicente Moreno Ferrero

Dr. Alejandro Atarés Huerta

Alberto Aguiar Domínguez

Relación del proyecto con los Objetivos de Desarrollo Sostenible (ODS)



Este proyecto impulsa o participa en el logro de 4 de los 17 ODS:

- **ODS 2 “Hambre cero”** (relación alta): el hecho de conseguir cultivos, en este caso de tomates, resistentes a condiciones adversas, como son la sequía y la salinidad, propicia las buenas cosechas y la posibilidad de suplir con la demanda de alimentos de la población.
- **ODS 3 “Salud y bienestar”** (relación media): en relación con el ODS anterior, para disfrutar de buena y salud y, por ende, de bienestar, es necesario una buena alimentación. Además, en el caso del tomate, tal y como se ha expuesto anteriormente, proporciona numerosos compuestos beneficiosos para la salud.
- **ODS 13 “Acción por el clima”** (relación media): un efecto del cambio climático es la pérdida de zonas cultivables. Debido a ello, el obtener plantas tolerantes a situaciones que en condiciones iniciales eran inviables para su desarrollo, supone un gran avance en la mitigación de los efectos climáticos y en evitar la pérdida de superficie forestal.
- **ODS 15 “Vida de ecosistemas terrestres”** (relación baja): a pesar de que en este proyecto se hable de solo de tomate, la identificación de genes relacionados con la tolerancia a sequía y salinidad abre la puerta a poder obtener diferentes especies vegetales tolerantes a la sequía, permitiendo la vida y variedad en los ecosistemas terrestres.

Agradecimientos

Como un viejo conocido me dijo un día: “*Es de bien nacido el ser agradecido*”, y la verdad que tiene bastante razón. Por ello, me gustaría agradecer a varias personas que han hecho de esta etapa, tal vez, la mejor de mi vida.

En primer lugar, agradecer profundamente a Alejandro Atarés y Vicente Moreno por la oportunidad de realizar mi TFM en su grupo, donde no solo he adquirido grandes conocimientos de cultivo *in vitro* y mejora vegetal, sino también otros valores de gran importancia como es el trabajo en equipo. En este punto, y saliéndome un poco de la formalidad, Álex, gracias por tu cercanía, tu serenidad y tu humor, palabra de maño.

En segundo lugar, muchísimas gracias a Alberto Aguiar y Marybel Jacquez por enseñarme desde el principio, por tanta ayuda prestada desinteresadamente, por las risas que hemos compartido en los descansos de café y hasta en el invernadero rodeados de tuta y agotados por el calor matinal de julio, por acogerme y tratarme como uno más dentro y fuera del laboratorio y un largo etcétera que ocuparía todo el espacio de agradecimientos.

En tercer lugar, y uno de los más especiales, gracias a todos los que formáis el 0.07: Álex, Mary, Alberto Mex, Rosy, Coni, Mayra, Albertillo, Abi, Nico, Paula, Yara, Pascual, a los nuevos TFGs (Rubén y María) y a los de prácticas (Elena, Adrià, Isabel y Clara). Os doy las gracias por todos los momentos compartidos, por todos esos cafés endulzados por interminables pasteles de diferentes partes del mundo y por las risas, por los Taca-Tacas, por las dianas, pels esmorzars, por las comidas y cenas, por las cerves... me alegra enormemente el poder haberos conocido y compartido este tiempo con vosotros y, aunque no sé si el día de mañana podré seguir compartiendo con vosotros tanto tiempo, jamás olvidaré la mesa redonda donde todos éramos un igual y donde tantas risas, lágrimas y planes surgieron y surgirán.

Agradecer también a todos compañeros del máster los cuales, además de alegrarme y amenizar las clases, muchxs se han convertido en muy buenxs amigxs con los que compartí fiestas, conciertos, comidas y risas y, si la vida nos lo permitió y haciendo referencia al tema de Love of Lesbian: “*Que os queda a mi lado muchos años (...). Brindemos deprisa, bebamos despacio, por nuestra hermandad*”. También agradecer a tres buenos amigos que han surgido por este máster pero no en clase: Badr, Carlos y Jerome. Compartir piso con vosotros ha sido la mejor experiencia de piso que he tenido y podríamos ser el inicio de un chiste (“esto que van un marroquí, un castellano, un namibio/alemán y un aragonés...”). Espero que la vida nos siga juntando y podamos seguir compartiendo y protagonizando anécdotas.

Finalmente, pero no menos importante, gracias a mi madre, Carmina, mi padre, Salvador, y mi hermana, Sandra. Habéis hecho posible que llegue hasta aquí, habéis aguantado mi estrés y tristeza cuando las cosas no iban como quería y me habéis ayudado en tantas veces que seguir la cuenta se me hace imposible. Ya sabéis que siempre que me necesitéis estaré a una llamada de distancia y que mis méritos son y serán vuestros.

Gracias.

Índice

Índice.....	4
Índice de figuras.....	6
Índice de tablas.....	9
Índice de abreviaturas.....	10
1. Resumen / Abstract.....	12
2. Introducción.....	14
2.1. Estrés.....	14
2.1.1. Estrés hídrico.....	14
2.1.2. Estrés salino.....	15
2.2. El tomate.....	18
2.2.1. Origen y domesticación.....	18
2.2.2. Importancia en la economía y en la investigación.....	19
2.3. Especies silvestres relacionadas con el tomate y su importancia.....	20
2.4. Cultivo <i>in vitro</i>	21
2.4.1. Mejora genética.....	21
3. Objetivos.....	24
4. Materiales y métodos.....	25
4.1 Materia vegetal.....	25
4.2. Medios de cultivo <i>in vitro</i>	25
4.3. Esterilización de semillas.....	26
4.4. Germinación de semillas y obtención de plántulas axénicas.....	26
4.5. Regeneración de explantes.....	26
4.6. Aclimatación y cultivo <i>in vivo</i> en invernadero.....	26
4.6. Transformación de <i>Solanum</i>	27
4.6.1. Preparación de <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	27
4.6.2. Obtención de explantes y transformación.....	28
4.6.3. Selección de plantas transgénicas.....	28
4.6.4. Individualización de brotes.....	29
4.6.5. Selección de plantas diploides mediante citometría de flujo.....	30
4.7. Identificación de líneas mutantes <i>in vitro</i>	30
4.8. Ensayos de crecimiento en sal <i>in vivo</i>	30

4.9. Cuantificación de parámetros fenotípicos	31
4.10. Cortes histológicos	31
5. Resultados	32
5.1. Protocolo de transformación para <i>S. pennellii</i>	32
5.1.1. Material vegetal de partida: accesión <i>S. pennellii</i> LA2657	32
5.1.2. Transformación de <i>S. pennellii</i> LA2657	32
5.1.3. Polinización de <i>S. pennellii</i> LA2657	37
5.2. Identificación de nuevos mutantes en condiciones de estrés salino	37
5.3. Fenotipado de mutantes de desarrollo frente a estrés salino e hídrico	39
5.3.1. Mutantes de raíz	40
5.3.2. Mutantes de parte aérea	44
6. Discusión	48
6.1. Protocolo de transformación para <i>S. pennellii</i>	48
6.2. Identificación de nuevos mutantes en condiciones de estrés salino	48
6.3. Fenotipado de mutantes de desarrollo frente a estrés salino e hídrico	49
6.3.1. Mutantes de raíz	49
6.3.2. Mutantes de parte aérea	50
7. Conclusiones	51
8. Bibliografía	52

Índice de figuras

Figura 1. Esquema de elementos tempranos que participan en la detección de sal y en su compartimentación y homeóstasis iónica. Las flechas en punta representan una regulación positiva mientras que las flechas truncadas reflejan la regulación negativa. (Isayenkov & Maathuis, 2019).....	16
Figura 2. Esquema de la señalización por fitohormonas y su interacción en la respuesta ante estrés. Las principales hormonas vegetales relacionadas con el estrés son las citoquininas (CK), el ácido abscísico (ABA), el ácido salicílico (SA), las giberelinas (GA), las auxinas (AUX), el ácido jasmónico (JA) y el etileno (ET), siendo ABA la fitohormona que regula el estrés osmótico. Las flechas negras presentan regulación positiva mientras que las flechas rojas truncadas muestran la regulación negativa. (Verma et al., 2016)	17
Figura 3. Esquema del proceso de domesticación de <i>S. lycopersicum</i> L. Se muestra a su vez el flujo de tamaño de los frutos de algunas especies silvestres relacionadas con <i>S. pimpinellifolium</i> (SP) y con <i>S. lycopersicum</i> var. <i>cerasiforme</i> (SLC) y de <i>S. lycopersicum</i> L (SLL). (Razifard et al., 2020).....	18
Figura 4. Taxonomía del tomate y especies silvestres relacionadas. (Peralta et al., 2008)	19
Figura 5. Gráfica de la producción de tomate en el 2018. Se muestran los 10 productores principales de tomate a nivel mundial y su producción en millones de toneladas. (Kumar et al., 2020).....	19
Figura 6. Gráfica de la variación en la idoneidad del área para el cultivo del tomate entre 1975 y 2050. Se indica la ganancia, sustentabilidad o pérdida del área cultivable (color sólido) y del control de la araña roja (patrón de rayas) en los mismos. (Litskas et al., 2019)	20
Figura 7. Esquema de los tipos de morfogénesis. a) morfogénesis directa e indirecta; b) morfogénesis organogénica o embriogénica Elaboración propia con Biorender™	21
Figura 8. Esquema de la estructura y el funcionamiento de la trampa de intensificadores (<i>Enhancer trap</i>). (Springer, 2000).....	23
Figura 9. Esquema de los plásmidos utilizados. a) plásmido pD991 con la trampa de potenciadores (promotor mínimo + 60 CaMV GUS ORF); b) plásmido pK2GW7:EGFP con el gen delator GFP; c) plásmido pD121 con el gen reportero GUS.....	27
Figura 10. Esquema de la toma de esquejes de <i>S. lycopersicum</i> L. (a) y de <i>S. pennellii</i> (b).....	28
Figura 11. Esquema del proceso de individualización de brotes. Se observa como a partir de un callo organogénico con muchos brotes, se corta cada brote, se eliminan las hojas de este y se coloca en un bote de aceituna con medio β suplementado con cefotaxima (bote de la derecha).	29
Figura 13. Plántulas de 9 días de <i>S. pennellii</i> LA2657. Se observa que parte las plántulas presentan un fenotipo albino (derecha) en comparación con las plántulas WT (izquierda). La línea naranja representa 1 cm.....	32
Figura 12. Plántulas de <i>S. pennellii</i> LA2657 línea 12. La escala representa 1 cm.	32
Figura 13. Plántulas de 14 días de <i>S. pennellii</i> LA2657 línea 12. La escala representa 1 cm.....	32
Figura 14. Regeneración de líneas WT de <i>S. pennellii</i> . De izquierda a derecha: línea 3, 5, 11 y 12. La escala representa 1 cm.....	33
Figura 15. Regeneración de explantes de <i>S. pennellii</i> LA2657 a partir de explantes de hoja de la línea 12. Las fotografías fueron tomadas el día 0 (izquierda), a los 14 días (centro) y a los 30 días (derecha) del cultivo. La escala representa 1 cm.	33

Figura 16. Comparación de la regeneración de las diferentes líneas T-DNA de <i>S. pennellii</i> . Se puede observar que las líneas 3 (primera) y 12 (cuarta) han regenerado correctamente, dando muchos brotes; mientras que la línea 5 (segunda) solo ha dado un brote y la 11 (tercera) no ha regenerado nada. La escala representa 1 cm.....	33
Figura 17. Comparación de la regeneración de las líneas T-DNA de <i>S. pennellii</i> . El callo de la línea 12 (izquierda) presenta un color verde amarillento y ha regenerado correctamente. El callo de la línea 11 (derecha) detiene su desarrollo y no regenera brotes. La escala representa 1 cm.	34
Figura 15. Seguimiento de los explantes y callos durante la organogénesis. Las fotografías están tomadas en campo claro (columna izquierda) y con filtro GFP-LP (columna derecha), donde se ve tanto la fluorescencia emitida por la GFP (verde) y por la clorofila (rojo). Las muestras son de: a) explante control (no transformado); b) explante transformado día 0; c) yema transgénica de 14 días; d) ápice transgénico de 21 días; e) brote transgénico de 28 días. La escala representa 1 mm.....	35
Figura 19. Identificación de brotes transgénicos y escapes. a) brotes individualizados transgénicos con raíces (superior) y escapes sin raíz (inferior); b) fotografías con luz blanca (izquierda), filtro GFP-EP (centro) y filtro GFP-LP (derecha) de brotes individualizados transgénicos (superior) y escapes (inferior).	36
Figura 20. Fenotipo de la línea 3263 ET MM en medio MG (izquierda) y en medio MG con 100 mM de sal (derecha). La escala representa 1 cm.....	38
Figura 21. Cortes histológicos de la zona basal del hipocótilo de la línea 3263 ET MM. Los cortes (izq) son de plantas control (WT) y de mutantes (M). A la derecha se observa aumentada x 2.5 la región de la médula. La escala representa 1 mm.	38
Figura 22. a) Gráfica de cajas del diámetro del hipocótilo de plantas WT (azul) y mutantes (naranja) de la línea 3263 ET MM. b) Gráfica de cajas del área celular de la región basal del hipocótilo de la línea 3263 ET MM. (Test T-student: *p < 0.05; **p < 0.01; ***p < 0.005).....	39
Figura 23. Fenotipo de la raíz de la línea 2641 ET MM a los 30 días. a) línea control; b) línea 1629 ET MM; c) línea 2641 ET MM. La escala representa 1 cm.	41
Figura 24. a) Longitud de las raíces de las diferentes líneas mutantes de raíz y del control (MM) a los 30 días en las diferentes condiciones estudiadas. Las barras representan el error estándar; b) Crecimiento relativo de la raíz en condiciones de estrés respecto a condiciones control (%) del control (MM) y de las líneas mutantes a los 30 días de cultivo. (Test T-student: *p < 0.05; **p < 0.01; ***p<0.005).	42
Figura 25. Fenotipo de la raíz y desarrollo aéreo de la línea 2641 ET MM a los 60 días. Las plantas control (WT) y mutantes (M) están clonadas en tres medios diferentes, MB3, MB3 + 75 mM de sal y MB3 + 100 mM de sal. Las escalas representan 1 cm.	43
Figura 26. Longitud de las raíces de la línea 2641 ET MM. Se muestran la comparación de las medias de la longitud de las raíces entre plantas control (WT) y mutantes (M) en tres condiciones diferentes. Las barras representan el error estándar (Test T-student: *p < 0.05; **p < 0.01; ***p<0.005).....	44
Figura 27. Fenotipos de varias línea mutantes analizadas. En la imagen se observan plántulas control (MM) y mutantes en medio MG (arriba) y en medio MG suplementado con 100 mM de NaCl (abajo). La escala representa 1 cm.....	45
Figura 28. Fenotipo de la línea 15 GUS MM a los 20 días (A) y a los 45 días (B). Se analizó el fenotipo tanto de plántulas control (WT) como de mutantes (M) cultivadas en condiciones control (MG) y con 100 mM de sal (MG100). En la parte izquierda de la figura se observan las plántulas y en la parte derecha los cotiledones (A) u hojas (B) de dichas plántulas.	46

Figura 29. Comparación de peso fresco (izq) y seco (dcha) de la parte aérea (tallo) y parte radicular (raíz) entre la WT y la línea 15 GUSMM. Las plantas controles (WT) y mutantes (M) fueron cultivadas tanto en medio MG como en medio MG suplementado con 100 mM de sal. Las barras representan el error estándar (Test T-student: *p < 0.05; **p < 0.01; ***p<0.005) 47

Índice de tablas

Tabla 1. Medios de cultivo (parte superior de las tablas) y sus componentes (izquierda).	25
Tabla 2. Composición de la solución nutritiva usada en el riego.....	27
Tabla 3. Dotación cromosómica de las diferentes plantas transgénicas de las líneas 3 (izquierda) y 12 (derecha).	36
Tabla 4. Seguimiento del proceso de transformación y producción de brotes trasngénicos individuales de las líneas estudiadas.....	37
Tabla 5. Análisis del modo de herencia de la mutación de la línea 3263 ET MM.....	39
Tabla 6. Análisis del número de insertos T-DNA con el gen <i>nptII</i> funcional de la línea 3263 ET MM...39	
Tabla 7. Líneas de mutantes de raíz analizadas en este proyecto.	40
Tabla 8. Líneas de mutantes de parte aérea analizadas en este proyecto.....	44

Índice de abreviaturas

ABA: Ácido abscísico

Abs: Absorbancia

AS: Acetosiringon

CAT: Catalasa

Cefo: Cefotaxima

CK: Citoquinina

cm: Centímetro

DNA: Ácido desoxirribonucleico

EMS: Metanosulfonato de etilo

ET: Trampa de potenciadores

g: Gramo

GFP: Proteína verde fluorescente

HF: Fluoruro de hidrógeno

I: Inositol

K: Kinetina

Kan: Kanamicina

kg: Kilogramo

L: Litro

m: Metro

M: Molar

MDHA: Malondialdehído

mg: Miligramos

Mha: Millón de hectáreas

Mins: Minutos

mL: Mililitros

MM: MoneyMaker

mM: Milimolar

Msnm: Metros sobre el nivel del mar

NaCl: cloruro de sodio (sal común)

nm: Nanometros

Nº: Número

° C: Grados centígrados

Ø: Diámetro

RNA: Ácido ribonucleico

ROS: Especies reactivas de oxígeno

s: Segundo

SOD: Superóxido dismutasa

Tim: Tiementina

WT: Salvaje (*wild type*)

Z: Zeatina

µE: Microeisnteins

µL: Microlitros

χ²: Chi cuadrado

1. Resumen / Abstract

1.1. Resumen

Las plantas se ven expuestas a diferentes estreses abióticos a lo largo de su ciclo vital, sufriendo diversos daños a nivel fisiológico que se traducen, desde un punto de vista agrónomo, en pérdidas de cultivos y de producción. En el caso del tomate (*Solanum lycopersicum* L.), estas pérdidas causadas por el estrés abiótico no se limitan solo a la pérdida de producción, sino a que el cultivo de esta planta se vea muy comprometido por el Calentamiento Global.

Para hacer frente dichos estreses, existe una red regulatoria muy compleja formada tanto por proteínas como metabolitos. El análisis de los genes que conducen a la síntesis de dichas proteínas y metabolitos es una de las herramientas fundamentales para entender los mecanismos de tolerancia de las plantas y poder llevar a cabo programas de mejora, obteniendo plantas resistentes a esas condiciones tan adversas. En el estudio de la función de los genes, el cultivo *in vitro* y la mutagénesis insercional constituyen una combinación de técnicas de lo más prometedora para alcanzar dicho objetivo, al reducir el tiempo y el espacio en la identificación de plantas con fenotipos interesantes y, por ende, en la selección de mutaciones en los genes de interés. A su vez, estas técnicas no solo se centran en especies modelo, sino que permiten el estudio de especies silvestres con caracteres de interés, como es el caso de *Solanum pennellii* como modelo de especie silvestre de tomate resistente a la sequía y salinidad.

De esta manera, en el presente proyecto se ha conseguido identificar, a partir de la colección de líneas mutantes de T-DNA de tomate del grupo, un nuevo mutante, el 3263 ET MM, con una respuesta hipersensible a la sal. Por otro lado, en el proceso de mejorar el fenotipo de mutantes de desarrollo previamente identificados por el grupo, se han identificado dos mutantes cuyo fenotipo revierte en presencia de sal: el 15 GUS MM, mutante de parte aérea que en presencia de sal retarda la clorosis y aumenta su biomasa foliar; y el 2641 ET MM, mutante de raíz cuyo desarrollo radicular aumenta drásticamente por la presencia de sal. Finalmente, con el objetivo de llevar a cabo en un futuro programas de mutagénesis insercional en *S. pennellii*, se ha conseguido establecer un protocolo de transformación para *Solanum pennellii* ac. LA2657 y, a pesar de una tasa de transformación baja, se han obtenido las primeras líneas transgénicas de dicha accesión LA2657 de *S. pennellii*.

Palabras clave: Tomate; mutagénesis insercional; cultivo *in vitro*; *Solanum pennellii*; protocolo; transformación; mutantes de raíz; mutantes de parte aérea.

Autor: Gabriel Sánchez Atrián.

Localidad y fecha: Valencia, enero de 2025.

Tutores académicos: Alejandro Atarés Huerta y Vicente Moreno Ferrero.

Director experimental: Alberto Aguiar Domínguez.

1.2. Abstract

Plants are exposed to different abiotic stresses throughout their life cycle, suffering various physiological damages that translate, from an agronomical point of view, into crop and production losses. In the case of tomato (*Solanum lycopersicum* L.), these losses caused by abiotic stress are not only limited to yield loss, but the cultivation of this plant is severely compromised by Global Warming.

Translated with DeepL.com (free version) To cope with these stresses, there is a very complex regulatory network consisting of both proteins and metabolites. The analysis of the genes that lead to the synthesis of these proteins and metabolites is one of the fundamental tools for understanding plant tolerance mechanisms and for carrying out breeding programmes to obtain plants that are resistant to such adverse conditions. In the study of gene function, *in vitro* culture and insertional mutagenesis are a promising combination of techniques to achieve this goal, reducing time and space in the identification of plants with interesting phenotypes and, therefore, in the selection of mutations in the genes of interest. At the same time, these techniques not only focus on model species, but also allow the study of wild species with traits of interest, as is the case of *Solanum pennellii* as a model of a wild tomato species resistant to drought and salinity.

In this way, the present project has managed to identify, from the group's collection of tomato T-DNA mutant lines, a new mutant, 3263 ET MM, with a hypersensitive response to salt. On the other hand, in the process of improving the phenotype of developmental mutants previously identified by the group, two mutants have been identified whose phenotype reverses in the presence of salt: 15 GUS MM, an aerial part mutant that retards chlorosis in the presence of salt and increases its leaf biomass; and 2641 ET MM, a root mutant whose root development is drastically increased by the presence of salt. Finally, with the aim of carrying out insertional mutagenesis programmes in *S. pennellii* in the future, a transformation protocol has been established for *Solanum pennellii* ac. LA2657 and, despite a low transformation rate, the first transgenic lines of this LA2657 accession of *S. pennellii* have been obtained.

Keywords: Tomato; insertional mutagenesis; *in vitro* culture; *Solanum pennellii*; protocol; transformation; root mutants; shoot mutants.

2. Introducción

2.1. Estrés

El estrés se puede definir de diferente manera atendiendo al contexto del que se esté hablando. De este modo, de manera biológica el estrés se puede entender como una gran presión que afecta a las funciones normales de los organismos, impidiendo la plenitud del potencial genético para funciones esenciales como el desarrollo, reproducción o crecimiento (Ashraf & Harris, 2005), mientras que desde una perspectiva agrícola, el estrés es el fenómeno que limita la productividad del cultivo o lo destruye (Grime, 1979).

El estrés causado a los organismos, en este caso las plantas, puede dividirse en dos tipos atendiendo al elemento o factor que lo provoca: biótico, en el caso de que el estrés sea producido por organismos vivos, como ejemplo son los insectos o las bacterias; y abiótico, donde el estrés proviene por fenómenos ambientales como la sequía, la salinidad o las altas y bajas temperaturas, entre otros (Kranter et al., 2010). En este trabajo, la investigación se ha centrado en dos estreses abióticos muy relacionados, el estrés salino y el estrés hídrico. Ambos comparten la componente osmótica que dificulta la absorción de agua por parte de la planta. Además, el estrés salino incluye la componente iónica que está relacionada con los mecanismos de toxicidad inducidos por una mayor concentración de iones perjudiciales para la planta. Por tanto, aunque estos estreses tengan orígenes diferentes, es evidente que comparten rutas de señalización y mecanismos de defensa.

2.1.1. Estrés hídrico

El agua, aparte de representar aproximadamente el 85 % de la biomasa de las plantas, es el medio principal para el desarrollo de casi todos procesos fisiológicos y bioquímicos de las plantas, además de ser necesario para la fertilidad del suelo y para la biodisponibilidad y transporte de los nutrientes desde el suelo hasta las raíces (Oshunsanya et al., 2019). Debido a ello, la falta de agua en los cultivos puede provocar grandes daños, los cuales se traducen como una disminución en la calidad y cantidad de la producción.

En cuanto a las causas, el estrés hídrico puede ser provocado tanto por el déficit de agua y la alta salinidad como por el exceso de agua. Ahora bien, independientemente del origen del estrés hídrico, la planta es capaz de detectar ese déficit de agua mediante un mecanismo molecular complejo donde participan varios receptores de diferente naturaleza, como son los fitocromos phyA, phyB1 y phyB2 (Gavassi et al., 2017), la quinasa del receptor similar a la extensina rica en prolina (PERK) o las CrRLK, involucradas en la percepción de la presión de turgencia (Osakabe et al., 2014).

Una vez detectadas dichas condiciones desfavorables, comienzan tres tipos de reacciones diferentes para mitigar los daños causados por dicho estrés (Shao et al., 2008):

- Reacciones fisiológicas: modificaciones osmóticas (pérdida de turgencia de hojas y tallos), cierre estomático (evitar pérdida de agua por evapotranspiración), descenso del potencial hídrico en las hojas...
- Reacciones bioquímicas: incremento de enzimas antioxidantes (CAT, SOD...) y compuestos relacionadas con estreses (poliaminas, MDHA...), reducción de la concentración de ROS, descenso de la eficacia de la Rubisco...
- Reacciones moleculares: incremento de la expresión de genes relacionados con la biosíntesis de ABA y de genes de respuesta a ABA, síntesis de proteínas como LEA, DSP, RAB...

El inicio de estos procesos, a pesar de que se llevan a cabo para mitigar los daños causados por el estrés hídrico, tiene también otros efectos sobre las plantas, de los cuales, si nos centramos en lo fisiológico, nos encontraríamos con:

- **Longitud del tallo:** la sequía afecta negativamente a la tasa de división celular y al ciclo celular de las células del meristemo, provocando que el tallo no pueda crecer y que las plantas presenten un tamaño inferior a las plantas que se encuentran en condiciones ideales (Nelissen et al., 2018). De esta manera, la energía y agua ahorrada en la síntesis de nuevas hojas y brotes es destinada al desarrollo radicular.
- **Morfología radicular:** la raíz es el tejido encargado tanto de la captación de agua y nutrientes como de la fijación de las plantas al suelo, por lo que las raíces tienen un papel crucial en la tolerancia al estrés hídrico. Para ello, las raíces pueden: evitar la elongación de la raíz primaria (Kondo et al., 2000); o modificar su arquitectura y anatomía llevando a cabo, por ejemplo, la lignificación de la raíz primaria, lo que evita su deshidratación en las capas superficiales del suelo, la refuerza para favorecer su penetración a capas más profundas y mejora la fijación (Hazman & Brown, 2018).
- **Área foliar:** las hojas controlan en gran medida el uso de agua gracias a su plasticidad, ganando o perdiendo turgencia según la cantidad de agua disponible. Es por ello por lo que, ante condiciones de estrés hídrico, se producen tanto el envejecimiento y caída de las hojas antiguas como la disminución de la cantidad y el tamaño de las nuevas hojas, provocando, por ende, una disminución de la tasa fotosintética y, por tanto, de la producción (Reddy et al., 2004).
- **Biomasa total:** sabiendo que el estrés hídrico afecta negativamente al tamaño de las plantas, al área foliar y al sistema radicular, es lógico establecer que las plantas bajo estrés hídrico presentarán una biomasa inferior. Sin embargo, aunque esto se da tanto en las etapas vegetativas como en las reproductivas (durante la producción), los efectos del estrés hídrico se incrementan en esta última fase (Ge et al., 2012).

2.1.2. Estrés salino

La salinidad en agricultura hace referencia a la presencia de una alta concentración de sales en el suelo, lo que puede deberse tanto a un hecho natural, como puede ser la introgresión del mar en el ecosistema terrestre; como antropogénico, como es el incremento de actividades agrícolas e industriales perjudiciales, entre otros. Para hacernos una idea del problema de la salinización del suelo, se estima que más de 1100 Mha de superficie terrestre total y entre el 20 y 50 % del suelo irrigado están afectados por la salinidad. (FAO, 2021)

A nivel de las plantas, este incremento de la concentración de sales en el suelo les resulta tóxico, perjudicando su crecimiento y desarrollo mediante: estrés hídrico, ya que las sales incrementan el potencial osmótico del suelo impidiendo que las raíces tomen el agua; citotoxicidad, por exceso de iones de sodio y cloro, incrementando las ROS, entre otros; y desequilibrio nutricional, impidiendo la toma de nutrientes por la sal y dificultando rutas metabólicas como la fotosíntesis. (Isayenkov & Maathuis, 2019; Quintero et al., 2002; Sharma et al., 2019).

A pesar del daño causado, a través de la evolución, las plantas han podido desarrollar mecanismos de tolerancia a suelos salinos, entre los cuales se destacan:

- **Compartimentación y homeostasis iónica:** las plantas son capaces de mantener la homeostasis iónica intracelular mediante el control de la afluencia de los iones y con su compartimentación. De esta manera, realizando un gran gasto energético, las plantas son capaces de absorber iones necesarios y agua y eliminar o aislar los iones perjudiciales.

Para conseguir dicho control y compartimentación de iones como el sodio, las plantas llevan a cabo tres estrategias principales: restringir su entrada a la célula, aumentar la expulsión del sodio hacia fuera de la célula e incrementar la compartimentación de dicho ion en la vacuola.

En dichas estrategias participan numerosas proteínas, como las codificadas por los genes hipersensibles a la sal (SOS): SOS1 (antiportador de Na^+/H^+ que expulsa iones de sodio hacia el apoplasto) o SOS5 (proteína de adhesión superficial celular que ayuda en el mantenimiento de la integridad y arquitectura de la pared celular) (Quintero et al., 2002). También intervienen los transportadores de potasio de alta afinidad (HKT) que excluyen iones de sodio de los brotes sensibles (Hauser & Horie, 2010), las bombas de protones como la H^+ -ATPasa de membrana plasmática, la H^+ -ATPasa vacuolar y la H^+ - pirofosfatasa vacuolar; y los antiportadores Na^+/H^+ (NHX), que secuestran las iones de sodio en la vacuola (Figura 1)

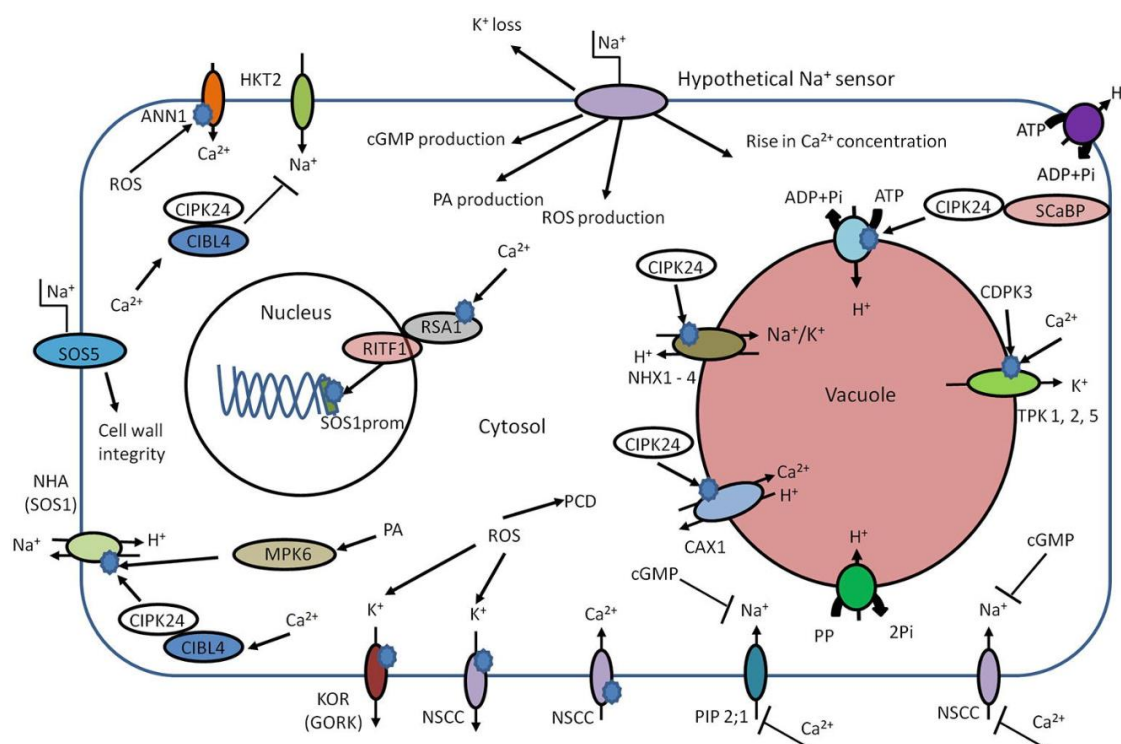


Figura 1. Esquema de elementos tempranos que participan en la detección de sal y en su compartimentación y homeostasis iónica. Las flechas en punta representan una regulación positiva mientras que las flechas truncadas reflejan la regulación negativa. (Isayenkov & Maathuis, 2019)

- **Acumulación de sustancias de ajuste iónico:** una de las respuestas más comunes en las plantas es la acumulación de moléculas osmoprotectoras en el interior celular, como ejemplo son la prolina y la glicina betaína. Estas moléculas participan en el ajuste iónico intracelular, en la desintoxicación de ROS y en la estabilidad de la membrana (Sharma et al., 2019).
- **Defensa antioxidante:** el estrés salino, al igual que el resto de los estreses abióticos, provocan un incremento en la concentración de ROS, las cuales provocan daños tanto a los lípidos de las membranas como a las proteínas y ácidos nucleicos. Debido a ello, las plantas acumulan en el

citósol tanto enzimas antioxidantes, como son la catalasa (CAT) o la superóxido dismutasa (SOD), y moléculas no enzimáticas de bajo peso molecular, como los ascorbatos o la glicina betaína (Azeem et al., 2023; Hoque et al., 2008).

- **Acción hormonal:** las fitohormonas u hormonas vegetales son moléculas reguladoras esenciales de las plantas que participan en un amplio número de procesos, desde el crecimiento hasta la defensa frente a estreses y la fructificación.

Dentro de las fitohormonas se pueden diferenciar nueve grupos de hormonas bien caracterizadas, donde cada grupo va a participar en unos procesos concretos, aunque se dan algún tipo de interacción con otros grupos (Figura 2).

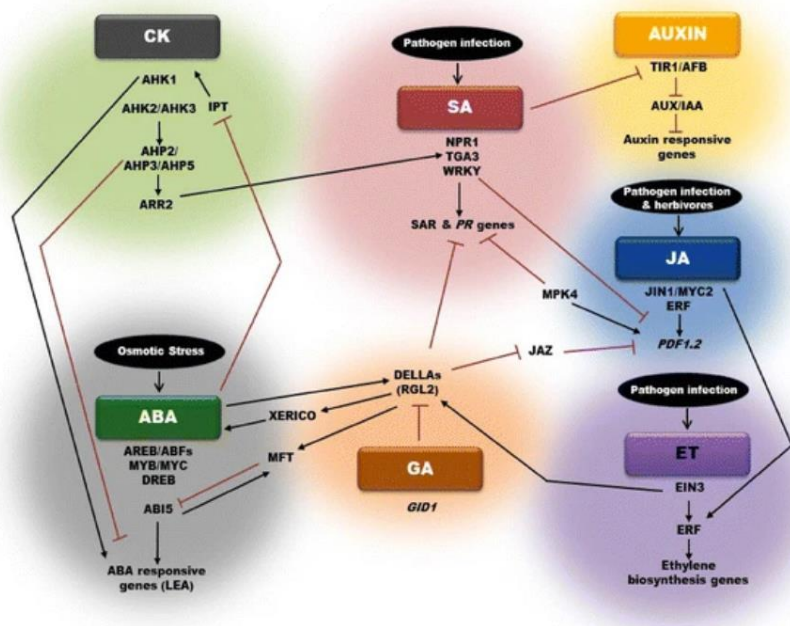


Figura 2. Esquema de la señalización por fitohormonas y su interacción en la respuesta ante estrés. Las principales hormonas vegetales relacionadas con el estrés son las citoquininas (CK), el ácido abscísico (ABA), el ácido salicílico (SA), las giberelinas (GA), las auxinas (AUX), el ácido jasmónico (JA) y el etileno (ET), siendo ABA la fitohormona que regula el estrés osmótico. Las flechas negras presentan regulación positiva mientras que las flechas rojas troncadas muestran la regulación negativa. (Verma et al., 2016)

En el caso del estrés salino e hídrico hay varias hormonas vegetales que participan, entre las cuales se destacan el ABA y las citoquininas. El ácido abscísico (ABA) aumenta su concentración endógena ante condiciones de sequía para coordinar la defensa de la planta mediante el cierre estomático, el cese del crecimiento radicular, la inducción de genes de proteínas relacionadas con la tolerancia a sequía y la interacción con la ruta de síntesis de otras hormonas (Zhang et al., 2006). Las citoquininas, por el contrario, al ser una fitohormona que favorece el crecimiento, la transpiración y la fotosíntesis disminuye su concentración endógena en condiciones de sequía (Farber et al., 2016; Li et al., 2019).

- **Regulaciones epigenéticas:** la epigenética es el estudio de los cambios heredables en la estructura de la cromatina que no implica cambios en la secuencia de DNA. Dentro de estos cambios encontramos la metilación del DNA, las modificaciones y variantes de las histonas y ciertos RNAs no codificantes (ncRNA). Estas modificaciones van a alterar la estructura y accesibilidad de la cromatina y, por ende, van a regular la expresión genética (Duan et al.; Singroha et al., 2022). En cuanto a la relación con el estrés salino, se ha visto en varios estudios con arroz que el estrés salino puede inducir variaciones en el patrón de metilación de ciertos genes sensibles al estrés (Karan et al., 2012) y de genes de tolerancia a la salinidad (Wang et al., 2020).

2.2. El tomate

El tomate (*Solanum lycopersicum* L.) es una planta dicotiledónea perteneciente a la familia *Solanaceae*, que engloba a otras plantas de gran interés económico como son las patatas (*Solanum tuberosum*), las berenjenas (*Solanum melongena*) o los pimientos (*Capsicum annuum*). Desde un aspecto más botánico, la planta del tomate es una planta herbácea perenne autógama de crecimiento indeterminado, es decir, cuando su brote primario acaba en una inflorescencia, la yema axilar próxima al ápice meristemático crece y prosigue con el desarrollo de la planta, repitiéndose este proceso indefinidamente. Su hoja es una hoja compuesta por 7 - 9 foliolos lobulados cubiertos por tricomas que prosiguen por el tallo. Sus flores están formadas por 5 o más pétalos amarillos en cuyo interior se encuentran 5 o 6 estambres que rodean al ovario, el cual presenta como mínimo 2 carpelos. En lo relacionado a su fruto, el tomate es una baya carnosa cuyo tamaño, forma y color son de gran variedad. Además, cada fruto contiene en su interior al menos dos espacios, los lóculos, donde se encuentran las semillas protegidas por el mesocarpio y el endocarpio (Kumar et al., 2020; López Marín, 2017).

2.2.1. Origen y domesticación

Su origen se sitúa en el oeste de América del Sur, desde el norte de Ecuador hasta el norte de Chile, donde las especies silvestres de tomate crecieron en diversos hábitats, marcados por diferentes geografías y climas. A partir de su origen, el tomate ha sufrido un proceso de domesticación desde su antecesor conocido más antiguo, *S. pimpinellifolium*, hasta el tomate que se conoce hoy en día. Este proceso no se conoce a la perfección, sin embargo, la hipótesis más respaldada por datos morfológicos y genéticos que intenta explicar dicho proceso (Bai & Lindhout, 2007; Razifard et al., 2020) establece la idea de que en primer lugar se llevó a cabo una pre-domesticación en la región andina, a partir de la cual de *S. pimpinellifolium* se originó *S. lycopersicum cerasiforme*, el cual presentaba un tamaño de fruto superior a *S. pimpinellifolium*. Una vez surgió *S. l. cerasiforme*, este se llevó a Mesoamérica (el actual México), donde sucedió la domesticación real y cuyo resultado se tradujo en la obtención de las variedades tradicionales de tomate con frutos de gran tamaño (Figura 3). Serían estas últimas variedades las que los españoles llevarían a Europa en el siglo XVI, donde comenzaría la expansión de este cultivo hacia el resto del mundo. Además, en el proceso de expansión se prosiguió con la mejora organoléptica del fruto del tomate, donde al principio se llevó mediante cruces tradicionales y seleccionando aquellas frutas con las características más interesantes para su consumo (tamaño grande, sabor...); pero a partir del siglo XX surgieron las industrias semilleras que, basándose en el principio del híbrido F1, consiguieron las variedades de tomate que se comercializan actualmente y cuyas semillas no pueden ser reutilizadas por los agricultores debido a la segregación de la descendencia (Bergougnoux, 2014).

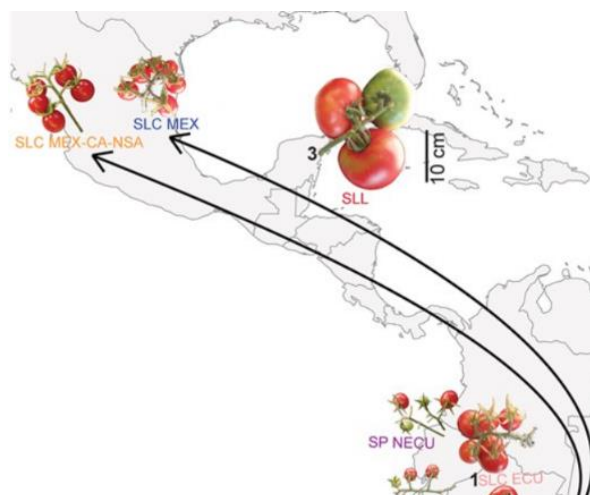


Figura 3. Esquema del proceso de domesticación de *S. lycopersicum* L. Se muestra a su vez el flujo de tamaño de los frutos de algunas especies silvestres relacionadas con *S. pimpinellifolium* (SP) y con *S. lycopersicum* var. *cerasiforme* (SLC) y de *S. lycopersicum* L (SLL). (Razifard et al., 2020)

Dado dicho origen, la taxonomía del tomate y especies silvestres es bastante compleja, aunque la clasificación que actualmente se toma por la más completa establece que dentro del género *Solanum*, el tomate pertenece a la sección *Lycopersicon*, la cual se divide a su vez en cuatro grupos: el grupo *Lycopersicon*, que incluye a *S. lycopersicum* L.; el grupo *Neolycopersicon*, donde se localiza *S. pennellii*; el grupo *Eriopersicon*; y el grupo *Arcanum* (Figura 4). (Peralta et al., 2008)

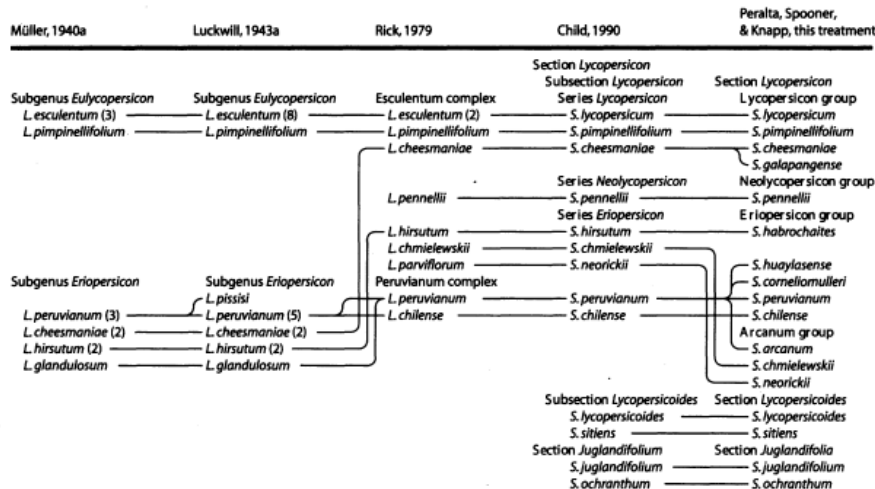


Figura 4. Taxonomía del tomate y especies silvestres relacionadas. (Peralta et al., 2008)

2.2.2. Importancia en la economía y en la investigación

El tomate es, tras la patata, la especie hortícola más importante de mundo, cuya producción ha ido en aumento. Para hacerse una idea, en 2018 se produjeron 170 millones de toneladas a nivel mundial, siendo China la primera productora de tomate y España ocupando la 8ª posición (Figura 5).

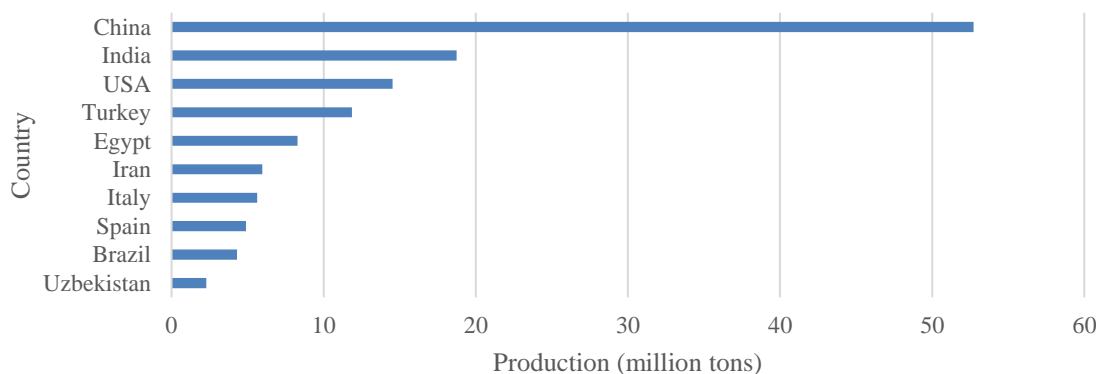


Figura 5. Gráfica de la producción de tomate en el 2018. Se muestran los 10 productores principales de tomate a nivel mundial y su producción en millones de toneladas. (Kumar et al., 2020)

La gran producción de este fruto se debe a su demanda, yendo su consumo desde los 61,9 kg a los 198,9 kg per cápita. Este consumo tan alto viene dado principalmente por dos factores claves. El primero de ellos hace referencia al valor nutricional del tomate, siendo fuente de numerosos metabolitos beneficiosos para la salud como son el licopeno, la vitamina C o los flavonoides (Friedman, 2013). Por otro lado, la gran variedad de formas de comercialización y consumo del tomate, que van desde el fruto fresco hasta salsas, cremas o el producto deshidratado.

Aparte de la importancia económica, el tomate presenta una gran variedad de factores que hacen que sea una especie modelo en la investigación científica: su genoma está secuenciado (The Tomato Genome Consortium) y no es muy grande (900 Mb), su cultivo se puede llevar a cabo en diferentes

condiciones ambientales, su floración es independiente del fotoperiodo, su reproducción es autógama aunque se pueden llevar a cabo cruces con otras especies de manera sencilla, se puede reproducir por esquejes y regenerar a partir de diferentes tejidos vegetales (Bergougnoux, 2014). Sin embargo, a pesar de lo comentado, el tomate ha ganado gran interés en el ámbito científico debido al peligro que supone el Cambio Climático en el cultivo de este fruto tal y como se conoce hoy en día. Este hecho se debe a diversos fenómenos, como son las altas temperaturas, la sequía, la salinidad, el incremento de plagas del tomate (como la araña roja) lo que provocará la pérdida directa de cultivos en ciertas regiones, principalmente países africanos, de oriente medio, sur de Asia, China y México (Figura 6). Aparte, países de la cuenca mediterránea, como es el caso de España, Italia, Grecia y Marruecos, pueden tener serios problemas en el suministro de riego a los cultivos, lo que dificultaría también el cultivo y cosecha del tomate (Litskas et al., 2019; Saadi et al., 2015).

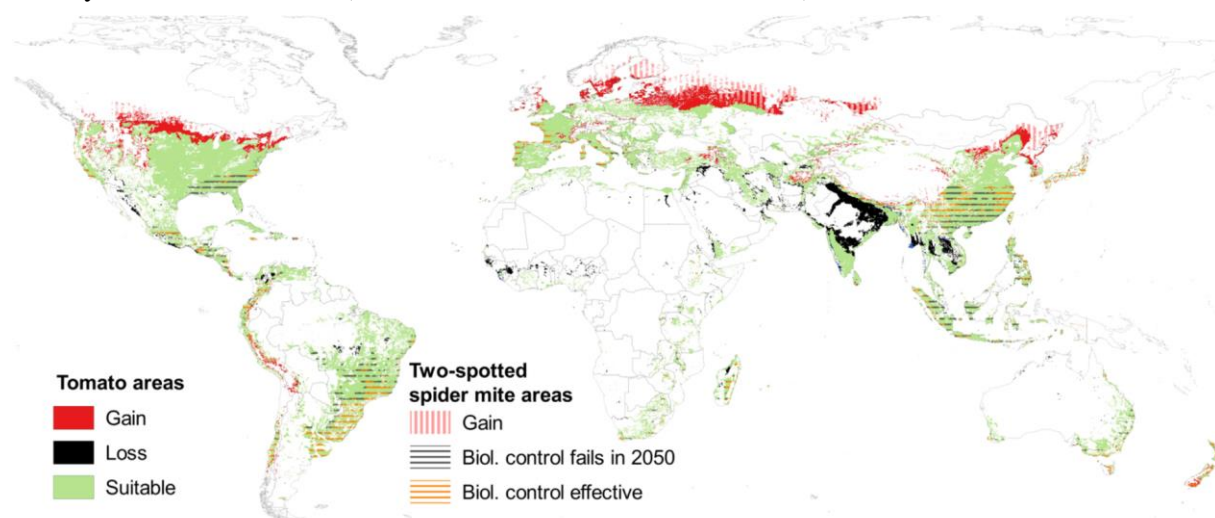


Figura 6. Gráfica de la variación en la idoneidad del área para el cultivo del tomate entre 1975 y 2050. Se indica la ganancia, sustentabilidad o pérdida del área cultivable (color sólido) y del control de la araña roja (patrón de rayas) en los mismos. (Litskas et al., 2019)

2.3. Especies silvestres relacionadas con el tomate y su importancia

Tal y como se ha explicado anteriormente, el tomate surgió a lo largo del oeste de América del Sur, donde la geografía andina, la diversidad ecológica de los hábitats y los diferentes climas propiciaron un aislamiento genético que desembocó en el origen de diferentes especies silvestres de tomate. Estas especies silvestres se adaptaron a unas condiciones muy concretas, como pueden ser los climas cálidos y secos, alturas de hasta 3300 m sobre el nivel del mar, el ataque de diferentes plagas y enfermedades, etc. Esta diversidad de especies silvestres de tomates se traduce en una gran variabilidad genética lo que hace de las especies silvestres una fuente de recursos genéticos de gran interés para llevar a cabo programas de mejora genética (The 100 Tomato Genome Sequencing et al., 2014).

S. pennellii procede de las costas de Perú y del norte de Chile, donde los hábitats predominantes son del tipo rocoso seco y arenoso con alturas que van desde los 0 a los 2300 msnm (Peralta & Spooner, 2007). Estas condiciones desfavorables han hecho que esta especie silvestre presente una tolerancia notoria frente al estrés hídrico y salino, lo que le hace idóneo para identificar genes de tolerancia a dichos estreses y llevar a cabo programas de mejora, tal y como se ha demostrado en numerosos estudios (Bolger et al., 2014; Cano et al., 1998; Shalata et al., 2001). Tiene hojas más pequeñas que tomate, compuestas únicamente por 5 folíolos lobulados y con un mayor número de estomas en el envés. Su fruto es muy pequeño, de color verde y con unas semillas pequeñas. Además, mientras que

S. lycopersicum L. es autocompatible, *S. pennellii* es principalmente autoincompatible (Muñoz-Sanz et al., 2021), aunque sí que existen algunas líneas que son autocompatibles (Peralta et al., 2008).

2.4. Cultivo *in vitro*

El cultivo *in vitro* de tejidos vegetales hace referencia al conjunto de técnicas que permiten el crecimiento en asepsia de células, tejidos y órganos procedentes de plantas bajo condiciones controladas. Desde sus inicios con Haberlandt a principios del siglo pasado, esta herramienta se ha vuelto crucial en la investigación básica y aplicada, ofreciendo tres aplicaciones diferentes: el saneamiento vegetal, al posibilitar la regeneración de plantas a partir de meristemos en los que no crecen diferentes agentes patógenos; la micropropagación, permitiendo mantener y multiplicar de una manera rápida genotipos de interés; y la mejora genética, apoyándose, entre otras muchas, en las técnicas de transformación del genoma vegetal, lo que da lugar a plantas que sirven tanto para la investigación básica como plantas con características interesantes o que producen metabolitos de gran interés económico (Espinosa-Leal et al., 2018; Thorpe, 2007).

El cultivo *in vitro* se aprovecha de la totipotencia de las células vegetales, es decir, de la posibilidad de generar un organismo entero a partir de una única célula en un proceso denominado morfogénesis. La morfogénesis parte de una muestra de tejido vegetal inicial, denominado explante, y puede tomar dos rutas diferentes: la morfogénesis indirecta, en la cual el tejido inicial formará primero un tejido desorganizado, denominado callo; o la morfogénesis directa, donde no se pasa por la formación del callo desorganizado (Figura 7a). Además, la morfogénesis puede ser de dos tipos atendiendo al producto final del proceso: organogénica, donde la morfogénesis da lugar a tallos (caulogénesis) o raíces (rizogénesis); o embriogénica, cuyo resultado son embriones somáticos (Figura 7b).

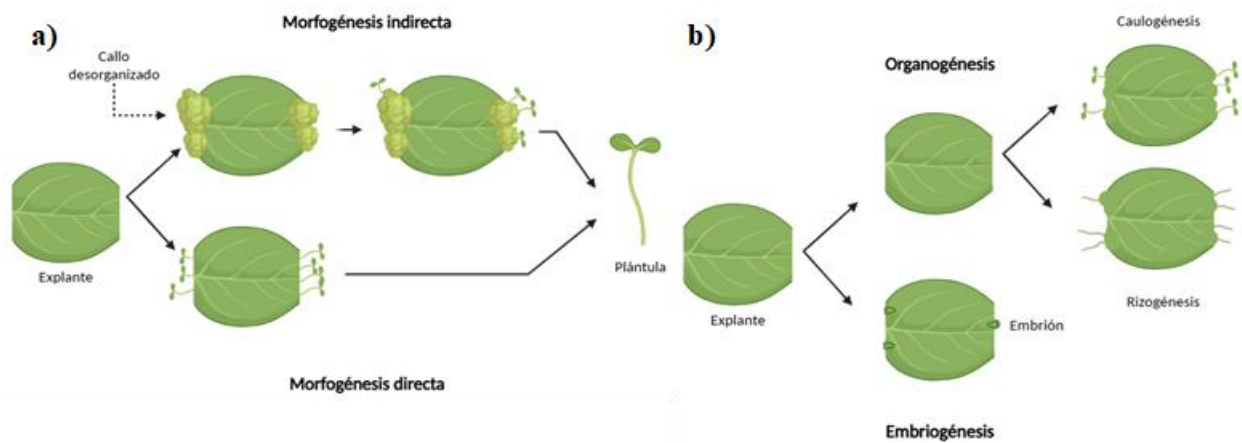


Figura 7. Esquema de los tipos de morfogénesis. a) morfogénesis directa e indirecta; b) morfogénesis organogénica o embriogénica. Elaboración propia con Biorender™

2.4.1. Mejora genética

La mejora genética vegetal hace referencia al área que busca un incremento o fortificación de los caracteres de interés en las plantas, los cuales pueden hacer referencia desde una mejor adaptación a condiciones de estrés como a un crecimiento de la producción de los cultivos (Xu et al., 2012). Este hecho tiene un gran interés hoy en día debido, principalmente, al aumento de la demanda de alimento por parte de una población creciente y a los efectos negativos del Cambio Climático sobre los cultivos

(Bailey-Serres et al., 2019). Para alcanzar este objetivo se pueden recurrir a diferentes técnicas, las cuales se pueden clasificar en tres grupos (Messmer et al., 2015):

- **Mejora convencional o tradicional:** este tipo de mejora se basa en la selección de plantas con características deseables que se cruzan entre sí, buscando mejorar las propiedades de la descendencia. A través de generaciones sucesivas, los cultivadores seleccionan las mejores plantas de cada generación para producir nuevas variedades.
- **Mejora asistida por marcadores (MAS):** esta mejora utiliza herramientas moleculares para identificar genes o marcadores específicos asociados con características deseadas en las plantas. Los marcadores moleculares son secuencias de ADN que se utilizan para identificar rasgos genéticos sin necesidad de observar físicamente las plantas y que permiten acelerar y optimizar los métodos de mejora convencionales.
- **Mejora biotecnológica:** la mejora biotecnológica involucra la modificación directa del material genético de las plantas. Esta práctica permite desde insertar genes específicos de otras especies para introducir características deseadas en la planta a través de la transformación mediada por *Agrobacterium tumefaciens*, hasta la mutación dirigida del DNA mediante diversos elementos que permiten la edición génica. Para llevar a cabo este tipo de técnicas es imprescindible el conocimiento previo de qué genes son los que intervienen en los caracteres que se pretenden mejorar.

Entre otras herramientas, la identificación de mutantes y posterior análisis del gen responsable del fenotipo mutante permite conocer cuáles son los genes clave de diferentes caracteres. La **mutagénesis inducida** se basa en la producción de mutaciones (pequeñas alteraciones en la secuencia del genoma y hereditarias) en los genes con el objetivo de analizar las consecuencias de ello. Este proceso se puede llevar a cabo tanto con agentes físicos (rayos X, radiación UV o rayos gamma), como agentes químicos (EMS, HF...) (Xu et al., 2012). Además, debido al cultivo de tejidos *in vitro* existe otra fuente de mutaciones, la **variación somaclonal**, la cual hace referencia al hecho de que plantas regeneradas *in vitro* sufren mutaciones en su DNA con una mayor frecuencia que las mutaciones espontáneas observadas en las plantas cultivadas *in vivo*. Este fenómeno también se puede utilizar para generar mutantes que ayuden a entender las funciones de los genes alterados en ellos (Bridgen et al., 2018).

Además de todas las posibilidades mostradas anteriormente, otra posibilidad para generar mutantes es la transformación con *Agrobacterium tumefaciens*, una bacteria fitopatógena que es capaz de transferir un fragmento de su plásmido Ti, denominado T-DNA, hasta el núcleo de la célula vegetal, donde se integrará de forma aleatoria en el genoma vegetal y se expresará (Krysan et al., 1999; Wang et al., 2014). Basándose en dicho mecanismo surge la mutagénesis insercional, una herramienta muy potente en la identificación de los genes claves de los caracteres de interés. La **mutagénesis insercional** se basa en la disrupción de un gen endógeno que ocurre en muchas ocasiones cuando se integra un T-DNA. Entre las plantas transgénicas se buscan aquellas con un fenotipo diferente al control. Una vez se identifican hay que averiguar si su inserción es la que ha provocado ese nuevo fenotipo por la alteración de la expresión de un gen endógeno. De esta forma, se puede relacionar fenotipo y función del gen (Krysan et al., 1999). Esta técnica tiene dos ventajas muy interesantes respecto a las otras dos formas de mutagénesis inducida: por un lado, ya que conocemos la secuencia del T-DNA la mutación queda etiquetada y se puede rastrear de una forma relativamente sencilla

donde se ha introducido y, por ende, establecer qué gen es el afectado, cosa que en las otras metodologías es mucho más complejo. Por otro lado, dentro del T-DNA se pueden colocar diversos genes reporteros u otras construcciones que pueden servir para diversos fines, como es el caso de las trampas génicas.

Las **trampas génicas** son unas herramientas de gran importancia en la identificación de la función de genes y las cuales se fundamentan en la expresión medible de un gen reportero. Se diferencian tres tipos atendiendo al mecanismo de acción que siguen en la identificación: trampa de promotores, trampa de genes y trampas de intensificadores (Springer, 2000). La trampa de intensificadores (*Enhancer trap*) consiste en un T-DNA que contiene un gen reportero, como es el gen *uidA* que codifica para la proteína GUS, regulado por un promotor mínimo que no puede activar por sí solo la expresión del gen pero sí con la ayuda de intensificadores vecinos (Figura 8). Debido a ello, esta trampa aporta a las líneas de mutantes T-DNA (o líneas T-DNA) un valor añadido si se insertan en el sentido adecuado ya que se podría analizar de una forma indirecta, mediante el patrón de expresión del gen delator, la expresión del gen endógeno al que afecta el T-DNA en diferentes tejidos o momentos del desarrollo (Springer, 2000). Esto ha ayudado a la caracterización funcional de diferentes genes, como se ha visto en trabajos en tomate (Meissner et al., 2000; Pérez-Martín et al., 2017; Sundaresan et al., 1995) y arroz (Johnson et al., 2005; Wu et al., 2003) entre otros.

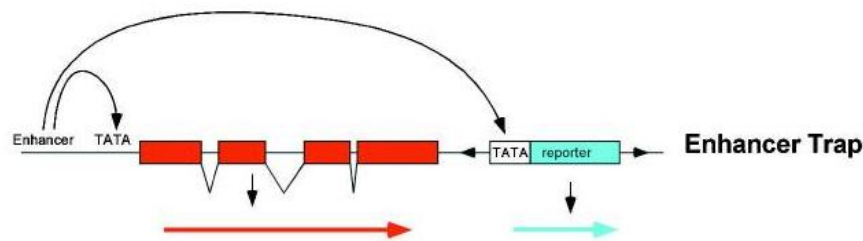


Figura 8. Esquema de la estructura y el funcionamiento de la trampa de intensificadores (*Enhancer trap*). (Springer, 2000)

En definitiva, la mutagénesis, y muy especialmente la insercional, está ayudando a identificar los genes clave que regulan los caracteres de interés agronómico y que son imprescindibles para poder llevar a cabo técnicas como la transformación genética y la edición génica con una perspectiva aplicada a la mejora de estos caracteres (Bridgen et al., 2018; Pasqual et al., 2014; Wijerathna-Yapa et al., 2022).

3. Objetivos

El objetivo final del presente trabajo es identificar genes relacionados con la tolerancia a sequía y salinidad mediante mutagénesis insercional de tomate y especies silvestres relacionadas. Para ello se establecieron los siguientes objetivos específicos:

- Establecer un protocolo de transformación eficaz para la accesión LA2657 de *S. pennellii* con la que no se había trabajado previamente en el grupo
- Obtener plantas transgénicas (TG1) y sus descendientes (TG2) de *S. pennellii* para identificar mutantes dominantes (TG1) y recesivos (TG2).
- Identificar y caracterizar mutantes hipersensibles o tolerantes al estrés salino
- Analizar el comportamiento de mutantes del desarrollo identificados en el grupo ante condiciones de estrés salino e hídrico.

4. Materiales y métodos

4.1 Materia vegetal

Para la realización de este proyecto se han empleado: diferentes líneas de *Solanum lycopersicum* cv. Money Maker y la línea LA2657 de *Solanum pennellii*; y líneas T-DNA de *S. lycopersicum* cv. Money Maker obtenidas por el grupo (Pérez-Martín et al., 2017) que presentan el vector pD991 con una trampa de intensificadores (*enhancer trap* o ET) o el plásmido pBI121 con el gen reportero gus en el caso de las líneas GUSMM. Además, en el caso de las líneas T-DNA, el material de partida fueron semillas TG2 obtenidas de la autofecundación de plantas transformadas y diploides TG1.

4.2. Medios de cultivo *in vitro*

El cultivo *in vitro* se caracteriza por utilizar diferentes medios de cultivo que garantizan unas condiciones de esterilidad y el aporte de agua y nutrientes necesarios para el desarrollo de la planta. Además permite añadir ciertos elementos con el fin de estudiar sus efectos en las plantas. Los medios usados en este proyecto se recogen en la Tabla 1. Aparte de dichos componentes, para gelificar los medios se añadió 6.8 g/L de agar bacteriológico (Pronadisa).

Tabla 1. Medios de cultivo (parte superior de las tablas) y sus componentes (izquierda).

Componentes	MG	MG + sal	MB2	MB2 + manitol	MB3	MB3 + sal	MB3 + manitol
Sales minerales	MS ^{1/2}	MS ^{1/2}	MS ¹	MS ¹	MS ¹	MS ¹	MS ¹
Sacarosa (g/L)	10.00	10.00	20.00	20.00	30.00	30.00	30.00
Inositol (g/L)	-	-	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10
Tiamina clorhídrica (mg/L)	-	-	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
NaCl (g/L)	-	5.84	-	-	-	5.84	-
Manitol (g/L)	-	-	-	18.30	-	-	18.30

Componentes	IKZ	IK	Ik + Tim + Kan	ϵ	α	β	β + Cefo
Sales minerales	MS ¹	MS ¹	MS ¹	MS ¹	MS ¹	MS ¹	MS ¹
Sacarosa (g/L)	30.00	30.00	30.00	30.00	20.00	20.00	20.00
Inositol (g/L)	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10
Tiamina clorhídrica (mg/L)	-	-	-	-	1.00	1.00	1.00
Vitaminas	SH ²	SH ²	SH ²	SH ²	-	-	-
Ác. indolacético (mg/L)	4.00	4.00	4.00	4.00	0.10	0.10	0.10
Kinetina (mg/L)	4.00	4.00	4.00	4.00	-	-	-
Zeatina (mg/L)	1.00	-	-	1.00	-	-	-
Timentina (mg/L)	-	-	300	-	-	-	-
Kanamicina (mg/L)	-	-	100	100	-	100	100
Cefotaxima (mg/L)	-	-	-	-	-	-	100

¹Sales MS (Murashige & Skoog, 1962); ²Vitaminas SH (Shahin, 1985)

Todos los medios utilizados se ajustaron a un pH de 5.7 con el uso del pHmetro GLP21+ marca Crison y se esterilizaron en un autoclave a 113 °C durante 30 min.

4.3. Esterilización de semillas

Todas las semillas utilizadas en los diferentes ensayos, antes de ser empleadas, se esterilizaron para eliminar la mayor parte posible de los patógenos superficiales, evitando una posterior contaminación de los medios de cultivo y consiguiendo, por ende, mantener las condiciones de asepsia necesarias. La esterilización de las semillas consistió en introducir paquetes de semillas en una disolución de lejía al 50 % con unas gotas del detergente Tween 20 durante 15 mins en el caso de *S. pennellii* y 30 mins en el caso del tomate. Pasado el tiempo de esterilización en lejía, se pasaron los paquetes de semillas por 3 pases de 200 mL de agua destilada y estéril durante 5, 10 y 15 minutos, respectivamente. En el caso de las semillas de tomate, para garantizar una mejor tasa de germinación, se repetía el proceso previamente comentado tras 24 horas de estar las semillas en agua destilada y estéril.

4.4. Germinación de semillas y obtención de plántulas axénicas

Una vez estuvieron las semillas esterilizadas dos veces, se pasaron las semillas de cada paquetes a una placa de Petri con papel de filtro humedecidos con 9 mL de agua destilada y estéril, se sellaron las placas con Parafilm y se llevaron a una estufa a 28 °C y en oscuridad durante 3 - 5 días. Transcurrido dicho tiempo, se tomaron las semillas que habían germinado (aquellas que presentaban radícula) y se pasaron a botes de cultivo con medio de germinación (MG). Dichos botes se pusieron durante 7 - 10 días en una cámara de cultivo con condiciones de fotoperiodo 16 horas de luz : 8 horas de oscuridad, una intensidad lumínica de $45 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ y una temperatura de $25 \text{ °C} \pm 2 \text{ °C}$.

4.5. Regeneración de explantes

Gracias a la totipotencia de las células vegetales, podemos regenerar una planta entera a partir de una muestra pequeña de casi cualquier tejido, además de poder estudiar posibles impactos de mutaciones en la regeneración. Para llevar a cabo dicho regeneración, se tomaron los cotiledones de plántulas de 7-9 días, se les hicieron unos cortes en la parte proximal y distal y se colocaron en una placa de Petri con medio de regeneración IKZ. Posteriormente, se selló la placa con Parafilm y se colocaron en las cámaras de cultivo. Pasado aproximadamente un mes, los callos organogénicos se pasaron a botes belgas con medio de elongación IK, condiciones en las cuales, los brotes que aparecieron en los callos pudieron elongar hasta tener el tamaño necesario para ser individualizados, es decir, para ser clonados cada brote en un bote individual.

4.6. Aclimatación y cultivo *in vivo* en invernadero

Las plantas se cultivan en el invernadero para ver su desarrollo *in vivo*, tanto en condiciones normales como bajo la presencia del algún agente estresante, y para obtener frutos y semillas. El proceso de pasar las plantas de condiciones *in vitro* a condiciones *in vivo* se denomina aclimatación y se llevó a cabo tomando plantas desarrolladas *in vitro* que presentaran un buen tamaño y desarrollo de la parte radicular. Se cultivaron en macetas con fibra de coco como sustrato. Además, debido a que las plantas *in vitro* no tienen bien desarrollados los estomas debido a la alta humedad a las que están expuestas dichas plantas *in vitro*, se colocó un vaso de plástico sobre la maceta, para evitar que la planta se secase. Este vaso, se fue quitando poco a poco hasta que los estomas fueran funcionales. Finalmente, tras unos días en esas condiciones, las plantas se trasplantaron a macetas más grandes con un sustrato formado por perlita y fibra de coco o turba en un invernadero con temperatura y fotoperiodo controlado. Se regaron mediante goteo con una solución nutritiva (Tabla 2) durante todo su desarrollo. Además, se realizaban tratamientos preventivos y curativos para combatir las plagas y enfermedades más habituales en esta especie.

Tabla 2. Composición de la solución nutritiva usada en el riego

Macronutrientes	Concentración (g/L)	Micronutrientes	Concentración (mg/L)
Ca(NO ₃) ₂ ·4H ₂ O	2.36000	Fe (quelato)	0.05600
KNO ₃	1.01200	ZnSO ₄ ·5H ₂ O	0.01400
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.98000	MnO ₄ ·H ₂ O	0.03320
KH ₂ PO ₄	0.27200	CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.00260
		H ₃ BO ₃	0.02800
		(NH ₄) ₆ MO ₇ ·4H ₂ O	0.00176

4.6. Transformación de *Solanum*

4.6.1. Preparación de *Agrobacterium tumefaciens*

Para la obtención de plantas transgénicas se llevó a cabo la transformación mediada por *A. tumefaciens*, el cual podía presentar dos plásmidos posibles (según cuál fuera el objetivo buscado):

- **Plásmido pD991 para generar las líneas de “Enhacer trapping” (ET):** este plásmido presenta en la región del T-DNA una trampa de intensificadores con el gen *uidA* bajo un promotor mínimo (Sánchez López, 2017) y un gen de resistencia a kanamicina (*nptII*) como marcador de selección (Figura 9 a).

- **Plásmido pK2GW7:EGFP para generar las líneas GFP:** este plásmido presenta en la región del T-DNA el gen de la proteína verde fluorescente (GFP) bajo el promotor constitutivo 35S y un gen de resistencia a kanamicina (*nptII*) como marcador de selección (Figura 9 b).

- **Plásmido pBI121 para generar las líneas GUS:** este plásmido tiene como gen reportero el gen de la proteína β-glucoronidasa bajo la regulación del promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor. Además, también presenta el gen *nptII* bajo el promotor NOS (Figura 9 c) (Romero Cortés, 2018).

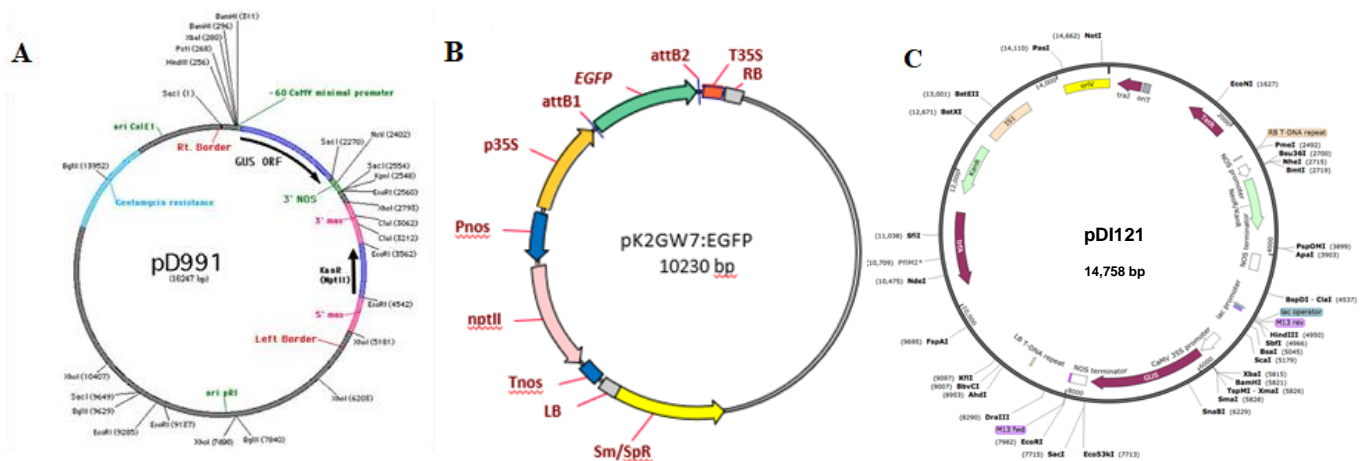


Figura 9. Esquema de los plásmidos utilizados. a) plásmido pD991 con la trampa de potenciadores (promotor mínimo + 60 CaMV GUS ORF); b) plásmido pK2GW7:EGFP con el gen delator GFP; c) plásmido pBI121 con el gen reportero GUS.

A. tumefaciens transformado se cultivó en medio LB a 25 °C durante 24 h para obtener una gran concentración de dicha bacteria e incrementar la tasa de transformación.

4.6.2. Obtención de explantes y transformación

En el estudio presente se quiso transformar tanto plantas de *S. lycopersicum* cv. MoneyMaker como plantas de la especie *S. pennellii* para alcanzar los objetivos propuestos. Por tal motivo, en primer lugar, se esterilizaron semillas de las dos especies y se cultivaron en medio MG.

En este punto hay que mencionar que los explantes utilizados para transformar eran cotiledones de 7 - 10 días para el cultivar de *S. lycopersicum* y hojas expandidas en el caso de *S. pennellii*. En esta especie, con dificultades para obtener semillas, este tipo de explantes tiene una fácil manipulación, una buena respuesta organogénica y a la facilidad de obtener gran cantidad de material vegetal sin necesidad de tener muchas plantas *in vitro*. Por los motivos comentados, en el caso de *S. lycopersicum* cv. MoneyMaker tras obtener plántulas axénicas (apartado 4.4.) se cortó el hipocótilo y los cotiledones (Figura 10 a), mientras que en el caso de *S. pennellii* se subcultivaron los meristemos apicales de las plántulas en botes de aceituna con MB3, donde las plantas se desarrollaron hasta producir varias hojas expandidas (Figura 10 b).

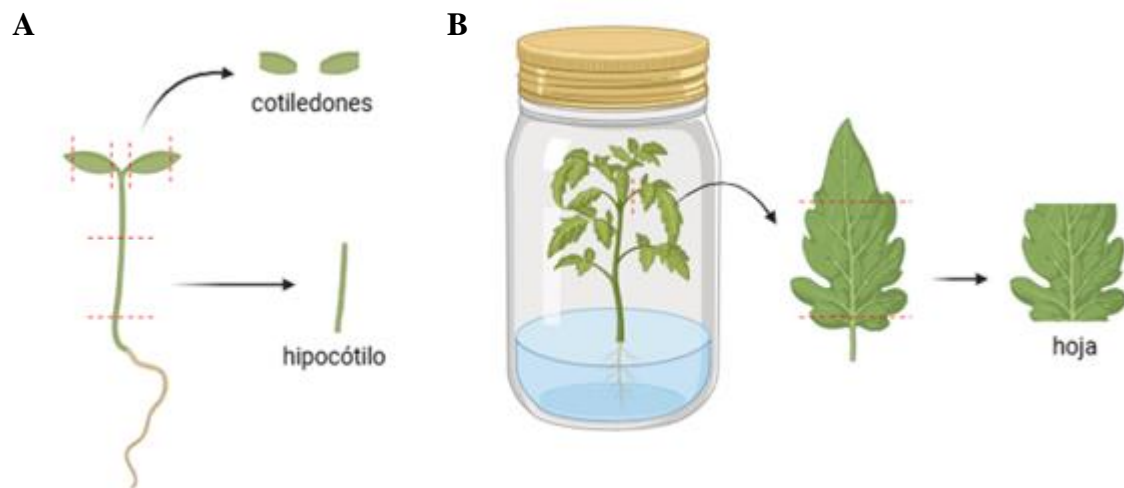


Figura 10. Esquema de la toma de esquejes de *S. lycopersicum* L. (a) y de *S. pennellii* (b).

Una vez se tuvo el material vegetal necesario para llevar a cabo cada tipo de transformación, se puso en contacto los explantes correspondientes (MoneyMaker o *S. pennellii*) con un cultivo en suspensión de *A. tumefaciens* durante 3 mins. Pasado el tiempo, se sacaron los explantes de la disolución, se secaron ligeramente sobre papel de filtro y se colocaron en una placa de Petri que tenía medio IK + Acetosiringona. Dichas placas con el cocultivo (*A. tumefaciens* y los explantes) se dejaron cubiertas con papel de aluminio en una cámara de cultivo durante 2 – 3 días, permitiendo la transferencia del T-DNA de *Agrobacterium* a los explantes.

4.6.3. Selección de plantas transgénicas

Una vez pasados los 2 – 3 días de cocultivo, se prosiguió realizando dos pasos cruciales: en primer lugar, se comenzó la eliminación de *A. tumefaciens* de la superficie de las hojas para evitar un crecimiento descontrolado de esta bacteria y porque ya había tenido tiempo para llevar a cabo su función (transferir el T-DNA). Para eliminar a *Agrobacterium* se tomaron los explantes y se pusieron

en contacto con una disolución de MB2 + MES + timentina. La timentina es un antibiótico bacteriostático que impide la división celular al interrumpir el ensamblaje del peptidoglicano.

Pasados 4 mins, se tomaron los explantes y se secaron sobre papel de filtro para, finalmente, colocarlos en placas de Petri con medio de regeneración y selectivo. En este caso, como el T-DNA presenta un gen de resistencia a la kanamicina (el gen *nptII*), el medio de cultivo fue IKZ + timentina + kanamicina. Los explantes se subcultivaron cada dos semanas en medio fresco para mantener la concentración deseada de antibióticos y disminuir tanto el crecimiento de *Agrobacterium* como el desarrollo de brotes no transformados (comúnmente llamados escapes); por otro lado, y con relación a lo comentado del nuevo medio, se comenzó a realizar una selección de aquellos explantes transformados. Para ello se añadió a los medios 0.5 mL de kanamicina 100 mg/mL, la cual permite solo a los explantes transformados enraizar y seguir su desarrollo.

4.6.4. Individualización de brotes

Tal y como se comentó en el apartado 4.5. “Regeneración de explantes”, el paso final de la regeneración es la individualización de los diferentes brotes provenientes de un callo organogénico. Por ello, cada brote aéreo del callo organogénico se cortó y se colocó en un medio de clonación selectivo, el medio alfa + kanamicina + cefotaxima (Figura 11).

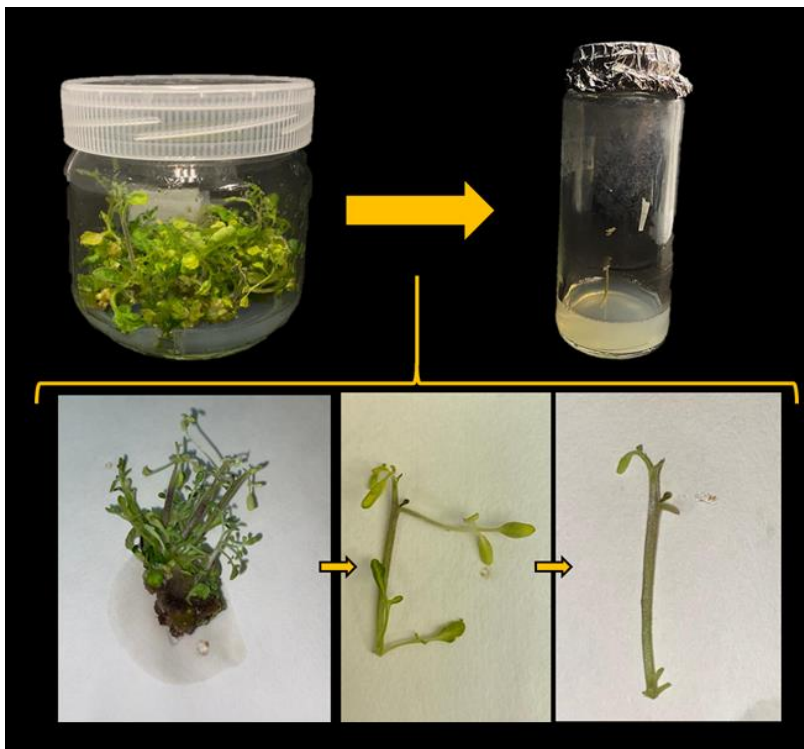


Figura 11. Esquema del proceso de individualización de brotes. Se observa como a partir de un callo organogénico con muchos brotes, se corta cada brote, se eliminan las hojas de este y se coloca en un bote de aceituna con medio β suplementado con cefotaxima (bote de la derecha).

Este medio permite que el explante (el brote aislado procedente del callo) pueda desarrollar tanto su parte radicular como aérea y, además, gracias a la presencia de la kanamicina, facilita diferenciar los brotes transgénicos de los escapes, ya que estos últimos no pueden desarrollar raíces y, con el paso del tiempo, mueren debido a la presencia del antibiótico. Además, a parte de la kanamicina, el medio presenta otro antibiótico, la cefotaxima, que, al igual que la timentina, inhibe la síntesis de la pared celular evitando la división celular. Este antibiótico se añadió al medio para evitar que las posibles bacterias de *A. tumefaciens* que siguieran en la superficie del explante incrementasen su número y provocaran la contaminación del medio.

4.6.5. Selección de plantas diploides mediante citometría de flujo

Una vez los brotes transgénicos desarrollaron raíces en el medio selectivo, se tomó una pequeña muestra de hoja y se midió el nivel de ploidía con el fin de ver cuál era la dotación cromosómica de dicho brote. El objetivo de medir la ploidía de los brotes es eliminar todas aquellas plantas con nivel de ploidía alterado para que la variabilidad genética diferente a la dada por la inserción del T-DNA sea la menor posible.

Para medir la dotación cromosómica se usó la citometría de flujo, proceso en el que se mide la cantidad de material genético que presenta cada célula individualmente. Para llevar a cabo la citometría, en primer lugar, se prepararon las muestras: se tomaron muestras de hoja y se colocaron en una placa de vidrio, se cortó las hojas con la ayuda de una cuchilla y se les añadió 200 μL de un tampón de aislamiento de núcleos (CyStain™ UV Precise P Nuclei Extraction Buffer) seguido de 800 μL de un tampón de tinción de DNA (CyStain™ UV Precise P Staining Buffer). Pasado un minuto, se tomó el líquido de la placa de vidrio y se pasó por un filtro para eliminar cualquier posible resto grande de tejido vegetal que pudiera obstruir al citómetro de flujo. Una vez se tuvieron todas las muestras a examinar, se pasó por el citómetro de flujo el patrón (en este caso se usó como patrón hoja de una planta WT) y seguidamente se pasaron de una en una las muestras de cada brote transgénico.

4.7. Identificación de líneas mutantes *in vitro*

Una vez se disponen de líneas transgénicas, en este caso tanto las obtenidas durante el proyecto como las provenientes de la colección de líneas T-DNA generadas previamente por el grupo, se tiene que ver si presentan algún fenotipo diferente al de las plantas WT. Este proceso se puede llevar tanto *in vitro* como *in vivo*, sin embargo, la identificación de mutaciones se lleva en primera instancia *in vitro*. Esto se debe a tres motivos principalmente: en condiciones *in vitro* es mucho más fácil controlar las condiciones de cultivo, la obtención de clones de las plantas analizadas es relativamente sencillo y amplia el número de individuos estudiados; y el tercer motivo es que el cultivo *in vitro* permite estudiar caracteres difíciles o imposibles de estudiar en condiciones *in vivo*. Por ejemplo, los mutantes albinos o con letalidad, donde en cultivos normales estas plantas no pasarían del estadio de germinación mientras que en condiciones de cultivo *in vitro* se puede llegar a estadios de plántulas o posteriores.

La identificación de mutantes *in vitro* se realizó mediante la técnica de vitro-dev, la cual consiste en: subcultivar los cotiledones e hipocótilos de plántulas de 7 – 9 días en medio de regeneración (IKZ) y en medio de regeneración y selectivo (ϵ), respectivamente; y los meristemos apicales de dichas plantas en medios de desarrollo (MB3), indicando de qué plántula provenía tanto el meristemo como el hipocótilo/cotiledón, para mantener la trazabilidad. Estos cultivos se pusieron en las cámaras de cultivo con las mismas condiciones que se indican en el apartado 4.4. durante 14 días, tiempo tras el cual se analizó si había alguna diferencia en la organogénesis de hipocótilo/cotiledón o en el desarrollo de la plántula a partir del meristemo, para detectar posibles fenotipos mutantes. Además, en el caso de los hipocótilos, también se analizó la tolerancia de estos a la kanamicina para determinar el número de insertos de cada planta transgénica. Para ello, se contó el número de hipocótilos resistentes y sensibles y se realizó una prueba χ^2 para confirmar que los datos observados se ajustaban a la distribución esperada, tomando un intervalo de confianza del 95 %.

4.8. Ensayos de crecimiento en sal *in vivo*

A pesar de que la identificación de mutantes se suele realizar mediante técnicas de cultivo *in vitro*, como se ha explicado en el apartado anterior, también se pueden realizar ciertos ensayos *in vivo* que

permiten identificar nuevos mutantes o corroborar el fenotipo de mutantes que se han encontrado *in vitro*. Uno de estos ensayos es el de crecimiento en sal, en el cual se dividieron las posibles plantas mutantes identificados *in vitro* cultivadas en sustrato en dos grupos: uno de ellos se regó con 3 L de disolución nutritiva (Tabla 2) cada 5 - 7 días (condiciones control); mientras que el otro se regó con 3 L de una solución de disolución nutritiva + 75 mM de sal (14.13 g) en el mismo intervalo de días. Además, aparte de las plantas problema, se colocaron plantas control para disminuir el efecto del ambiente en el resultado. Además, durante el desarrollo del ensayo de crecimiento en sal se tomaron fotos cada 7 días para registrar los avances de las plantas en ambas condiciones.

4.9. Cuantificación de parámetros fenotípicos

Durante el fenotipado de diferentes líneas transgénicas, se llevaron a cabo mediciones de varios parámetros atendiendo a tipo de mutante con el que se trabajaba. En el caso de los mutantes de raíz, se llevaron a cabo principalmente medidas de longitud de raíz, número de raíces secundarias, peso fresco y seco y cálculo del área celular mediante la aplicación ImageJ (<https://imagej.net/ij/index.html>), mientras que con los mutantes de la parte aérea, como ejemplo son los mutantes cloróticos, se analizó el peso fresco y seco, número de hojas expandidas, distancia entre nudos y se cuantificó la clorofila.

Finalmente, con los datos obtenidos, se realizó una comparación de las medias mediante el test estadístico T-Student (en el caso de solo dos poblaciones muestra) o ANOVA (en el caso de tres o más poblaciones muestra) con un valor de confianza del 95 % ($\alpha = 0.5$) en la página Social Science Statistics (<https://www.socscistatistics.com/>).

4.10. Cortes histológicos

En el fenotipado de los mutantes de raíz se llevó a cabo la preparación de cortes histológicos de la parte basal y central del hipocótilo. Para ello, se cortaron las muestras y se introdujeron en un pocillo de vidrio hueco relleno con 3 mL de agar D-1 low eeo al 5 % fundido. Tras dejar enfriar, se desmoldaron los tubos de agar con las muestras y se colocaron en un vibratomo Campden para ser cortadas a 25 μm . Tras tener los cortes, se colocaron en un portaobjetos y se tiñeron con azul de toluidina durante 40 s. Pasado el tiempo, se eliminó el colorante y se puso una gota de agua destilada y el cubreobjetos. Finalmente, se observó las muestras con ayuda de un estereomicroscopio Leica MZ 10F.

5. Resultados

5.1. Protocolo de transformación para *S. pennellii*

Para la investigación de la resistencia al estrés hídrico y salino de *S. pennellii*, en primer lugar fue necesario establecer un protocolo eficaz y reproducible de transformación de la accesión de *S. pennellii* LA2657 ya que era la primera vez que trabajábamos con esta accesión en el grupo.

5.1.1. Material vegetal de partida: accesión *S. pennellii* LA2657



Figura 12. Plántulas de *S. pennellii* LA2657 línea 12. La escala representa 1 cm.

Tras esterilizar, germinar y cultivar en medio MG las semillas de *S. pennellii* LA2657 se observó que parte de ellas presentaban un fenotipo albino (Fig. 12), ajustándose a un ratio 3:1 de plántulas WT:albinas correspondiente al de una mutación monogénica recesiva. Debido a dicho problema inicial se optó por elegir aquellas plántulas con un fenotipo aparentemente WT para mantenerlas en condiciones *in vitro*. De esta forma, se creó una pequeña colección de 27 plantas de *S. pennellii* LA2657, las cuales podían ser WT homocigotas o heterocigotas para la mutación albina. Además, cada planta se consideró una línea diferente para mantener la trazabilidad y, de las 27 líneas iniciales, se eligió aleatoriamente trabajar con las líneas 3, 5, 6, 8, 11 y 12.

5.1.2. Transformación de *S. pennellii* LA2657

Una vez se tuvieron las líneas para trabajar, lo primero que se hizo fue clonar cada planta en medio MB3 para obtener varias copias. Una vez las plantas crecieron, se aclimató una planta de cada línea y se llevaron al invernadero, con el fin de que estas plantas dieran fruto y se obtuvieran semillas F2, las cuales se utilizarían para saber si las 6 líneas elegidas eran WT homocigotas o heterocigotas para la mutación albina. De todas las plantas que se aclimataron, todas excepto la 6 y la 8 pudieron adaptarse y seguir con su desarrollo (Figura 13). Por este motivo, se decidió elegir las líneas que tenían copias aclimatadas como el material vegetal inicial para establecer el protocolo de transformación.

Para la transformación de la nueva accesión de *S. pennellii* LA2657, se empezó viendo como regeneraban las líneas elegidas. Para ello, se tomaron explantes de hoja de las líneas 3, 5, 11 y 12 y se cultivaron en medio de regeneración IKZ. Tras un mes, se observó una



Figura 13. Plántulas de 14 días de *S. pennellii* LA2657 línea 12. La escala representa 1 cm.

regeneración altamente eficaz en todas las líneas (Figura 14), lo que permitió abordar los experimentos de transformación con las cuatro líneas.

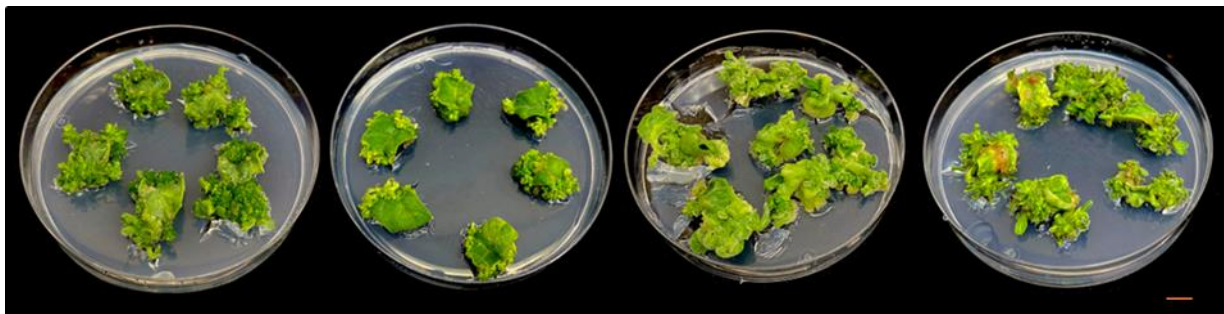


Figura 14. Regeneración de líneas WT de *S. pennellii*. De izquierda a derecha: línea 3, 5, 11 y 12. La escala representa 1 cm.

Tras cocultivar los explantes de hoja de las 4 líneas de *S. pennellii* accesión LA2657 con *A. tumefaciens* y lavarlos, se cultivaron en medio de regeneración IKZ hasta que los explantes presentaron callos organogénicos (Figura 15). Posteriormente, se llevó a cabo el subcultivo a medio de elongación IK suplementado con kanamicina.

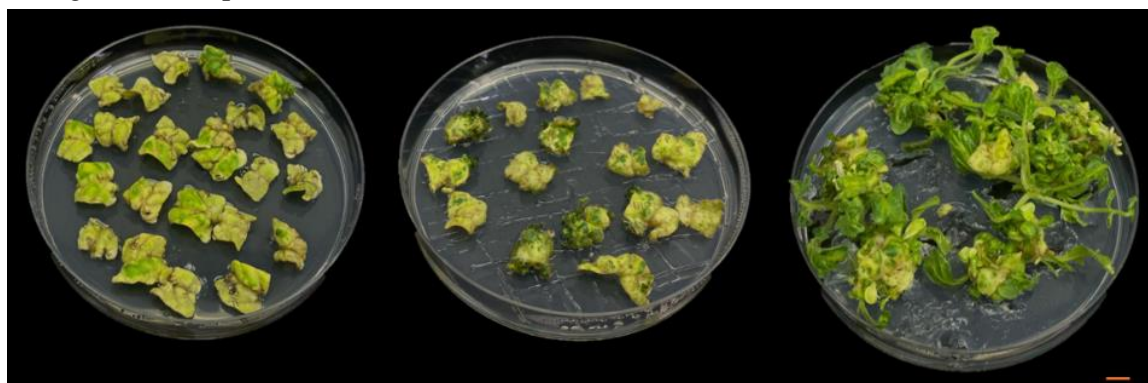


Figura 15. Regeneración de explantes de *S. pennellii* LA2657 a partir de explantes de hoja de la línea 12. Las fotografías fueron tomadas el día 0 (izquierda), a los 14 días (centro) y a los 30 días (derecha) del cultivo. La escala representa 1 cm.

Sin embargo, durante la regeneración y organogénesis de los explantes, en las líneas 5 y 11 se dio un problema en dichos procesos. En estas líneas, los callos detuvieron su desarrollo por un problema de pardeamiento o necrosis que no ocurría en las otras dos líneas que mantuvieron el comportamiento esperado (Figuras 16 y 17). Esto impidió la obtención de plantas transgénicas a partir de estas líneas.



Figura 16. Comparación de la regeneración de las diferentes líneas T-DNA de *S. pennellii*. Se puede observar que las líneas 3 (primera) y 12 (cuarta) han regenerado correctamente, dando muchos brotes; mientras que la línea 5 (segunda) solo ha dado un brote y la 11 (tercera) no ha regenerado nada. La escala representa 1 cm.



Figura 17. Comparación de la regeneración de las líneas T-DNA de *S. pennellii*. El callo de la línea 12 (izquierda) presenta un color verde amarillento y ha regenerado correctamente. El callo de la línea 11 (derecha) detiene su desarrollo y no regenera brotes. La escala representa 1 cm.

Visto este comportamiento diferencial, solo en el caso de los explantes transformados y no en los explantes testigo, se descartó la hipótesis de que lo observado estuviera ocasionada por causas del genotipo de las líneas y se asumió un problema puntual (preparación de medio de cultivo, estado de las plantas, inoculación de los explantes, etc.) como la causa de lo observado anteriormente. En cualquier caso, los experimentos de transformación se siguieron con las dos líneas que habían tenido un buen comportamiento inicial.

Para la transformación de los explantes se optó por llevar a cabo una transformación con un T-DNA que portase un gen reportero, en este caso GFP. De esta forma, aparte de poder obtener líneas T-DNA de *S. pennellii* se podía llevar a cabo un seguimiento más fácil del proceso mediante la observación de la fluorescencia producida por la GFP con el uso del estereomicroscopio de fluorescencia Leica MZ 10F, la unidad de iluminación láser pE-300^{white} y la cámara flexacam | c5 (Figura 18).

Por otro lado, durante la regeneración de los explantes transformados, se estableció que si se observaba un crecimiento de callo en regiones diferentes del explante se podían individualizar, ya que cada uno provenía de eventos de transformación diferentes. Esto hizo que se obtuvieran en algunos casos eficacias de transformación iniciales superiores al 100% (Tabla 4). De esta forma, tras obtener de las líneas 3 y 12, primero, callos desorganizados y, después, brotes, se aisló cada brote en medio β suplementado con cefotaxima. De esta manera, cada brote procedente de un callo diferente podía considerarse una línea T-DNA de *S. pennellii* LA2657. Aunque esto no aseguraba aún si los brotes eran transgénicos o escapes, es decir, brotes WT que han conseguido crecer en un medio selectivo a pesar de no tener el gen de resistencia necesario. Para determinar si un brote aislado era transgénico o un escape se hicieron dos cosas: por un lado, se observó si había desarrollo de raíz o no, ya que solo las plantas transgénicas podían desarrollar raíz en un medio suplementado con kanamicina (Figura 19 a). Por otro lado, se comprobaba si los brotes emitían fluorescencia bajo el estereomicroscopio al ser irradiados por un láser, lo que confirmaba que tenían la proteína GFP (Figura 19 b). De esta forma se descartaron los brotes considerados como escapes y se mantuvieron *in vitro* las líneas T-DNA de *S. pennellii*, pudiéndose hacer un análisis de la tasa de transformación de la nueva accesión (Tabla 4).

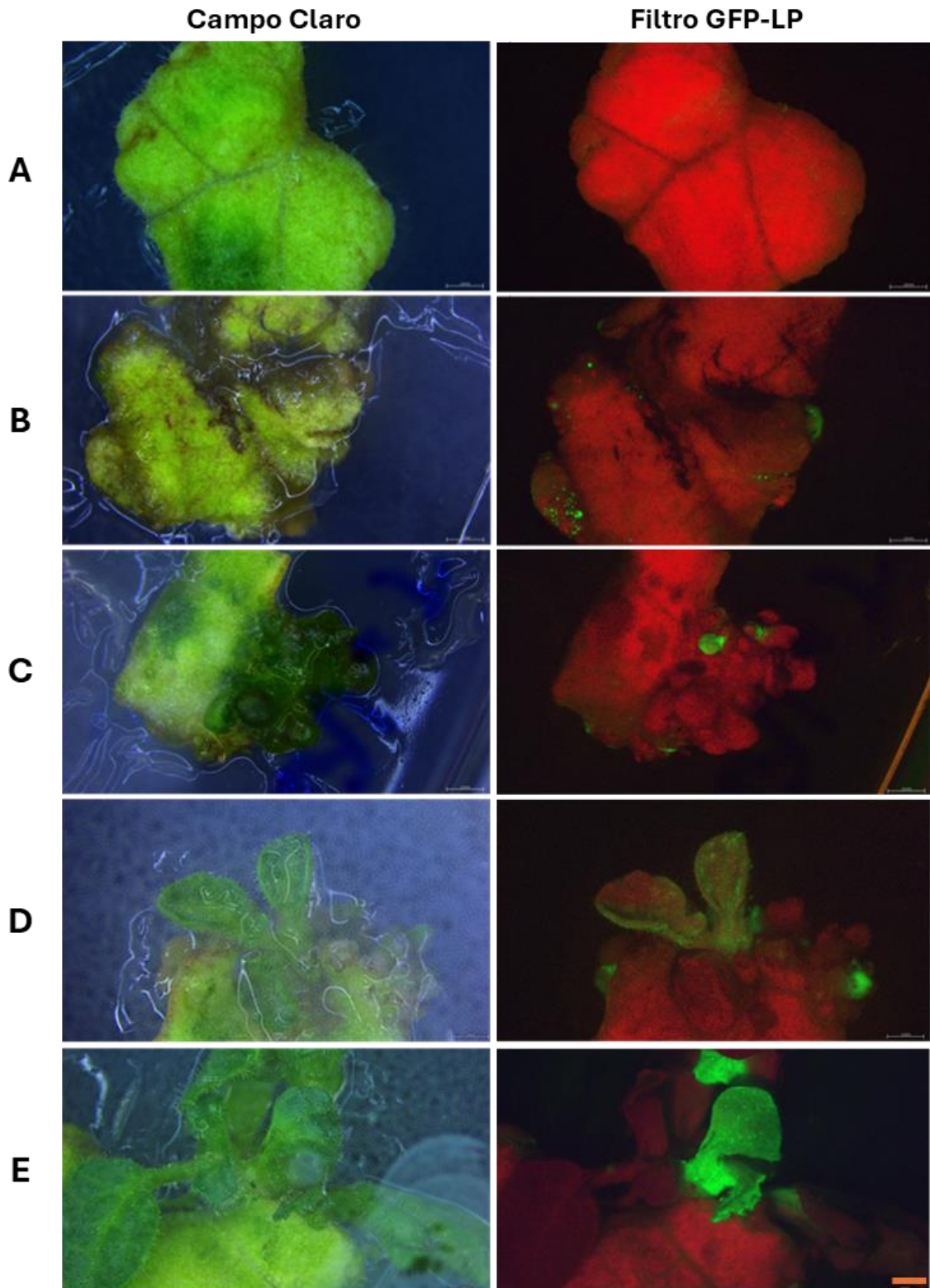


Figura 15. Seguimiento de los explantes y callos durante la organogénesis. Las fotografías están tomadas en campo claro (columna izquierda) y con filtro GFP-LP (columna derecha), donde se ve tanto la fluorescencia emitida por la GFP (verde) y por la clorofila (rojo). Las muestras son de: a) explante control (no transformado); b) explante transformado día 0; c) yema transgénica de 14 días; d) ápice transgénico de 21 días; e) brote transgénico de 28 días. La escala representa 1 mm.

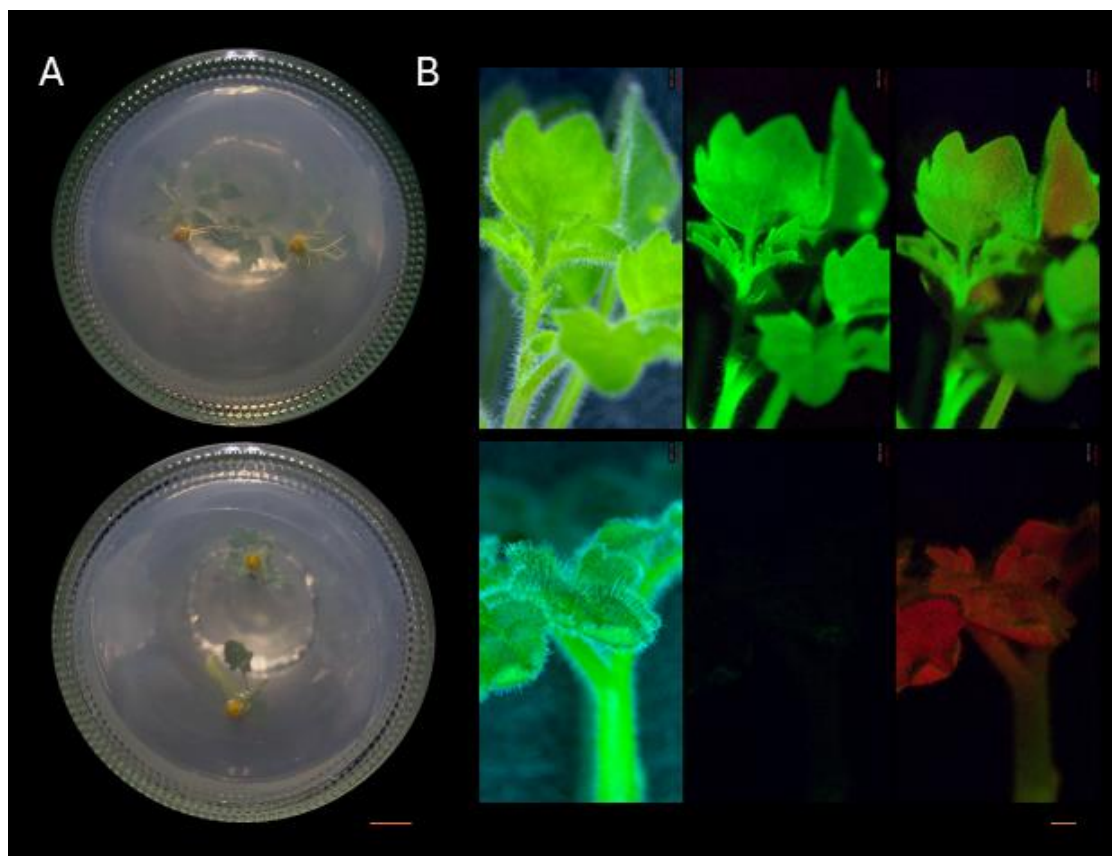


Figura 19. Identificación de brotes transgénicos y escapes. a) brotes individualizados transgénicos con raíces (superior) y escapes sin raíz (inferior); b) fotografías con luz blanca (izquierda), filtro GFP-EP (centro) y filtro GFP-LP (derecha) de brotes individualizados transgénicos (superior) y escapes (inferior).

Por último, se analizó la ploidía de las líneas T-DNA, ya que era necesario descartar todas aquellas plantas que no son diploides. Esto se hace para minimizar las variaciones no producidas por la inserción del T-DNA. Además, las plantas que no son diploides presentan un fenotipo diferente al parental y pueden presentar ciertos problemas, como la esterilidad. Tras pasar las muestras de hojas jóvenes por el citómetro de flujo, se obtuvieron los resultados recogidos en la Tabla 3.

Tabla 3. Dotación cromosómica de las diferentes plantas transgénicas de las líneas 3 (izquierda) y 12 (derecha). La dotación cromosómica (n) hace referencia al número de copias de cada cromosoma que tiene la planta, siendo: n = haploide; 2n = diploide; 3n = triploide y así sucesivamente.

Línea	Dotación cromosómica (n)
3 -2	4n
3 -3B	4n
3 -4	4n
12 -2A	≈3n
12 -2B	8n
12 -3B	4n
12 -3D	2n
12 -6	4n

Línea	Dotación cromosómica (n)
12 -7A	2n
12 -7B	2n
12 -11A	≈6n
12 -12	4n
12 -13	4n
12 -14A	2n
12 -14C	4n
12 -15	2n

Línea	Dotación cromosómica (n)
12 -19	2n
12 -20	2n
12 -24	2n
12 -25	4n
12 -27	2n
12 -28	2n

Tabla 4. Seguimiento del proceso de transformación y producción de brotes transgénicos individuales de las líneas estudiadas. A lo largo de la regeneración, parte de los explantes murieron y parte se pudieron dividir en diferentes callos organogénicos, lo que hace que el porcentaje de eficacia de transformación según callo (nº de callos organogénicos en el día 27 / nº de explantes iniciales) pueda ser mayor que el 100 %. La eficacia de transformación según brotes transgénicos hace referencia al número de estos divididos al número de explantes iniciales.

Línea	Explantos	Callos organogénicos		Brotes transgénicos		
	Número	Número	Eficacia de transformación (callo organogénico / nº explantes) (%)	Número	Número de diploides	Eficacia de transformación (brote transgénico diploide / nº explantes) (%)
3	24	17	71	3	0	0
5	19	11	58	0	0	0
11	23	26	113	0	0	0
12	19	43	226	18	10	53

5.1.3. Polinización de *S. pennellii* LA2657

Además de llevar a cabo la transformación de la nueva accesión *S. pennellii* LA2657, tal y como se ha comentado anteriormente, se aclimataron plantas de las líneas 3, 5, 6, 8, 11 y 12, de las cuales siguieron con su desarrollo todas menos la 6 y la 8. Con estas líneas se pretendía llevar a cabo su autofecundación para obtener frutos y semillas, con que analizar si estas plantas presentan o no la mutación albina comentada en el apartado 5.1.1. La polinización se está llevando a cabo tanto dejando a las flores sin tratar como autopolinizando manualmente. De momento, no se han obtenido frutos de ninguna de las líneas estudiadas.

5.2. Identificación de nuevos mutantes en condiciones de estrés salino

Se analizaron 25 líneas “*Enhancer trapping*” MoneyMaker para identificar nuevos mutantes del desarrollo temprano o que presentaran hipersensibilidad o resistencia frente al estrés por salinidad. De las 25 líneas analizadas, la línea 3263 ET MM mostró un desarrollo de la raíz bastante diferente en el medio con sal respecto al medio sin sal (Figura 20). Además, se llevaron a cabo cortes histológicos del hipocótilo, tanto de las plantas WT en sal como de las mutantes en sal, con el objetivo de analizar si la sal afectaba a la organización del tejido o de los haces vasculares. Se observaron ciertas diferencias en la parte basal del hipocótilo que estaba engrosada respecto del WT y que presentaban alteraciones en el tamaño de las células del córtex así como en la organización de los haces vasculares (Figura 21). Además, se midió el diámetro del hipocótilo y la superficie celular del córtex (10 células por planta) con ayuda de la aplicación ImageJ (Figura 22).



Figura 20. Fenotipo de la línea 3263 ET MM en medio MG (izquierda) y en medio MG con 100 mM de sal (derecha). La escala representa 1 cm.

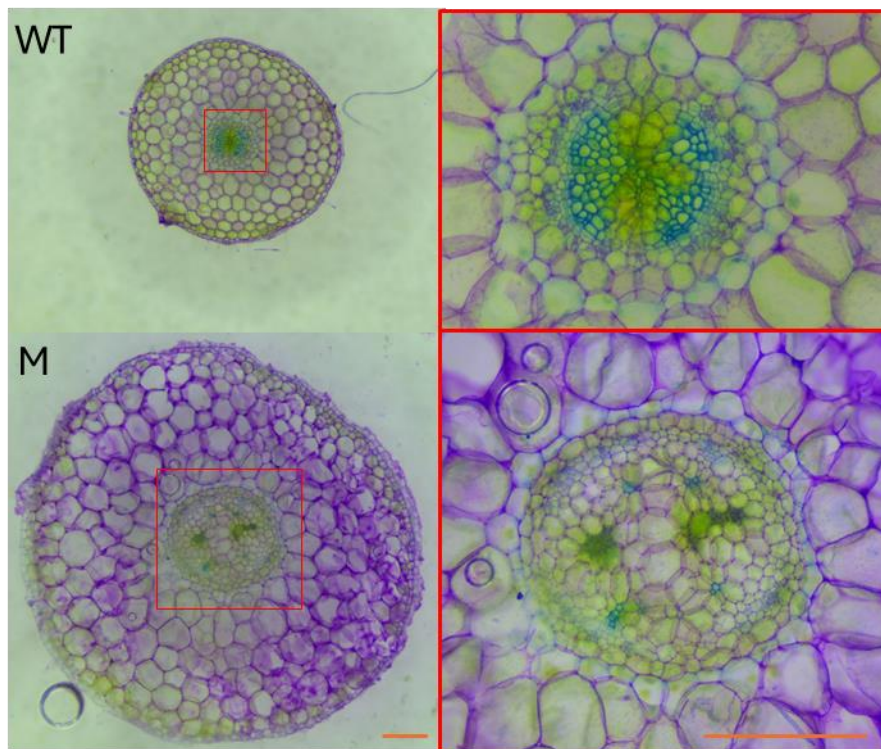


Figura 21. Cortes histológicos de la zona basal del hipocótilo de la línea 3263 ET MM. Los cortes (izq) son de plantas control (WT) y de mutantes (M). A la derecha se observa aumentada x 2.5 la región de la médula. La escala representa 1 mm.

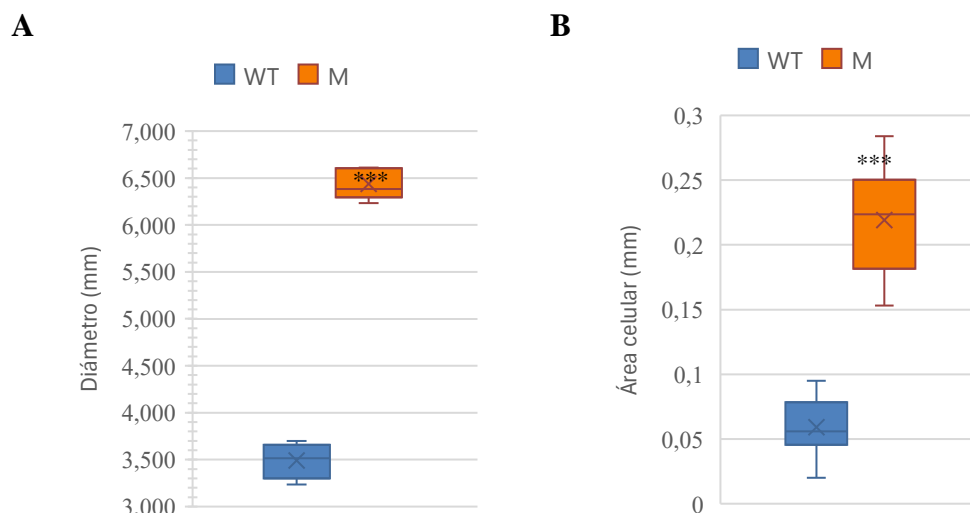


Figura 22. a) Gráfica de cajas del diámetro del hipocótilo de plantas WT (azul) y mutantes (naranja) de la línea 3263 ET MM. **b)** Gráfica de cajas del área celular de la región basal del hipocótilo de la línea 3263 ET MM. (Test T-student: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.005$).

Al llevar a cabo el análisis estadístico del mutante 3263 ET MM, entre los datos obtenidos de los experimentos de MG y MG suplementado con 100 mM de NaCl, se pudo confirmar, aplicando el test estadístico de la χ -cuadrado con una nivel de significancia del 95 %, que la proporción de individuos silvestres y mutantes se ajusta con una herencia monogénica recesiva, 3:1 (Tabla 5). Sin embargo, el análisis de homogeneidad indicó que las muestras no eran homogéneas. Una posible explicación podría ser que en condiciones control, sin sal, era necesario más tiempo para poder diferenciar el mutante del WT.

Tabla 5. Análisis del modo de herencia de la mutación de la línea 3263 ET MM.

	Segregación	Silvestre	Mutante	Total	χ^2
Datos	Observado	43	11	54	0.62
acumulados	Esperado (3:1)	40.5	13.5		

En cuanto a la resistencia a la kanamicina y, por tanto, el número de insertos, los datos también se ajustaron a una única inserción del T-DNA (Tabla 6). Además, los mutantes identificados fueron todos resistentes, lo cual no descartó la posibilidad de la cosegregación fenotipo mutante – inserto T-DNA.

Tabla 1. Análisis del número de insertos T-DNA con el gen *nptII* funcional de la línea 3263 ET MM.

	Segregación	Kan ^R	Kan ^S	Total	χ^2
Experimento	Observado	4	4	8	2.67
1	Esperado (3:1)	6	2		

5.3. Fenotipado de mutantes de desarrollo frente a estrés salino e hídrico

Otro objetivo principal del proyecto era ampliar el fenotipado de mutantes de desarrollo previamente identificados por el grupo, analizando cuál era su comportamiento frente al estrés hídrico y salino. Los mutantes analizados fueron mutantes de raíz, el órgano que está en contacto con el suelo y que tiene un papel fundamental para conseguir agua y nutrientes, y mutantes alterados en la coloración de las hojas ya que uno de los efectos que producen estos estreses es la aparición de clorosis en las plantas.

5.3.1. Mutantes de raíz

Para analizar la respuesta de los mutantes de raíz ante estrés salino y estrés hídrico, se esterilizaron, germinaron y se cultivaron en MG entre 60 y 120 semillas de cada una de las 4 líneas analizadas. Pasados 14 días, se cortaron los ápices meristemáticos de las plántulas mutantes y se subcultivaron el mismo número de ápices en medio MB3, MB3 suplementado con 100 mM de NaCl y MB3 con 100 mM de manitol. Las plantas se dejaron en dichas condiciones durante 30 días antes de analizar el fenotipo que presentaban en cada condición (Tabla 7).

Tabla 7. Líneas de mutantes de raíz analizadas en este proyecto.

Línea	Fenotipo mutante en MB3	Fenotipo mutante en manitol	Fenotipo mutante en NaCl
190 ET MM	Raíz embrionaria y adventicia afectada tanto <i>in vivo</i> como <i>in vitro</i>	Igual que en condiciones control	Igual que en condiciones control
1608 ET MM	Raíz embrionaria y adventicia gravemente afectadas tanto <i>in vivo</i> como <i>in vitro</i>	Igual que en condiciones control	Igual que en condiciones control
1629 ET MM	Raíz adventicia afectada	Igual que en condiciones control	Igual que en condiciones control
2641 ET MM	Raíz embrionarias y adventicias mutantes pero raíces aéreas normales	Igual que en condiciones control	Posible mejora del fenotipo de raíces adventicias en sal

Tres de los cuatro líneas mutantes estudiadas, como era de esperar, no presentaron cambios significativos respecto del WT en sus fenotipos por la presencia de sal o manitol (Figura 23). Sin embargo, la línea 2641 ET MM, que presenta alteraciones tanto en su raíz embrionaria como en las raíces adventicias, en presencia de sal, presentó un ligero crecimiento de sus raíces adventicias (Figura 23), lo que suponía cierta reversión del fenotipo mutante.

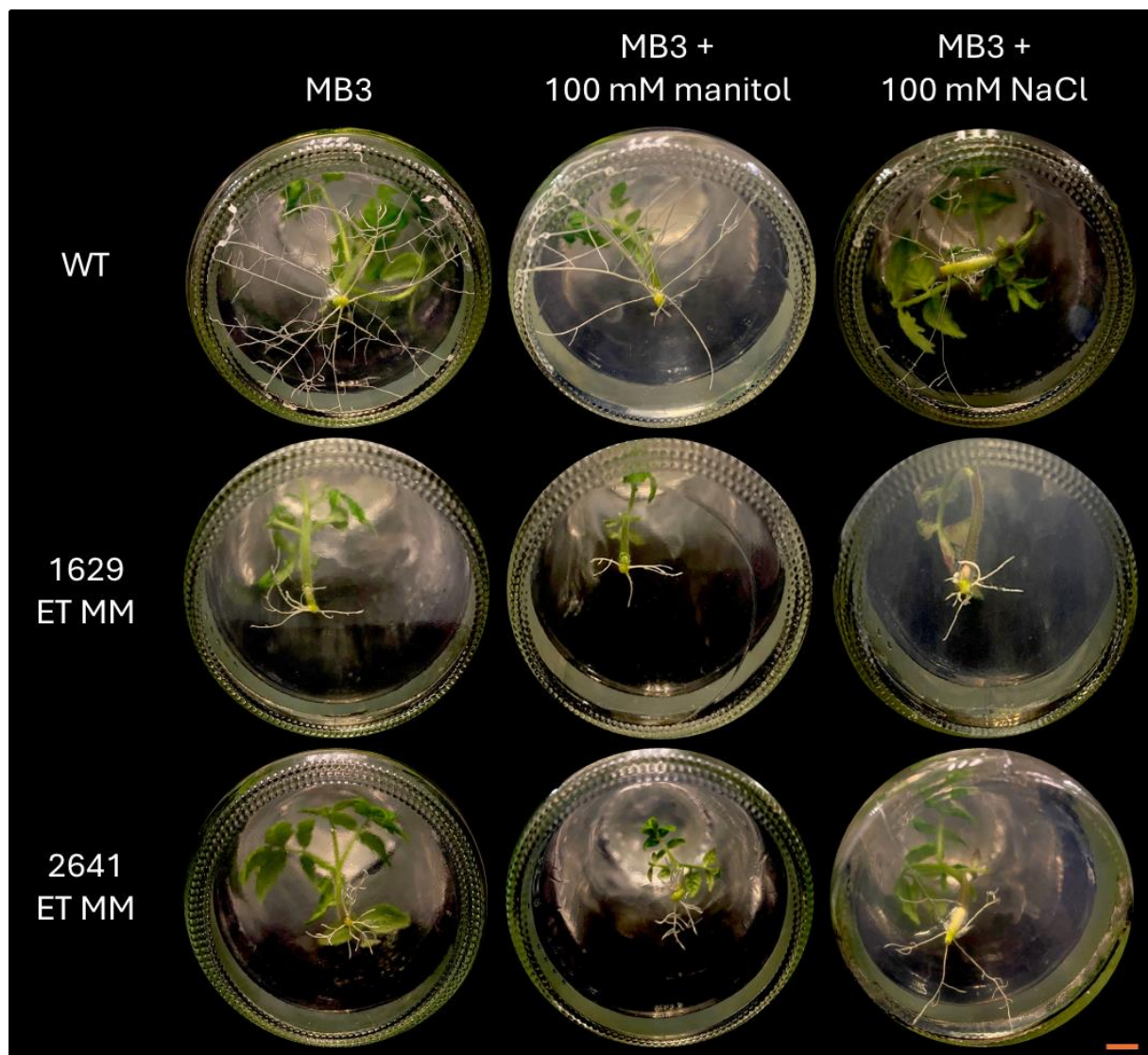


Figura 23. Fenotipo de la raíz de la línea 2641 ET MM a los 30 días. a) línea control; b) línea 1629 ET MM; c) línea 2641 ET MM. La escala representa 1 cm.

Para confirmar cuantitativamente lo observado, se llevó a cabo una medición de la longitud de las raíces de los mutantes y del control para observar cómo afectaban las diferentes condiciones al desarrollo radicular de las líneas estudiadas. El resultado fue que mientras que todas las líneas veían afectado su crecimiento radicular tanto por la presencia de manitol como de sal, la línea 2641 ET MM presentaba una longitud de sus raíces mucho mayor que en condiciones control y con manitol, donde la longitud era muy parecida (Figura 24 a). En términos de valores relativos, mientras que todas las líneas, incluido el control, perdieron entre un 13 y un 39 % en el caso con manitol, y entre un 22 y 70 % en el caso con sal, de la longitud de sus raíces respecto a la condiciones control (MB3), la línea 2641 ET MM incrementó un 5 % en manitol y un 175 % en sal la longitud radicular respecto a la longitud de sus raíces en medio control (Figura 24 b).

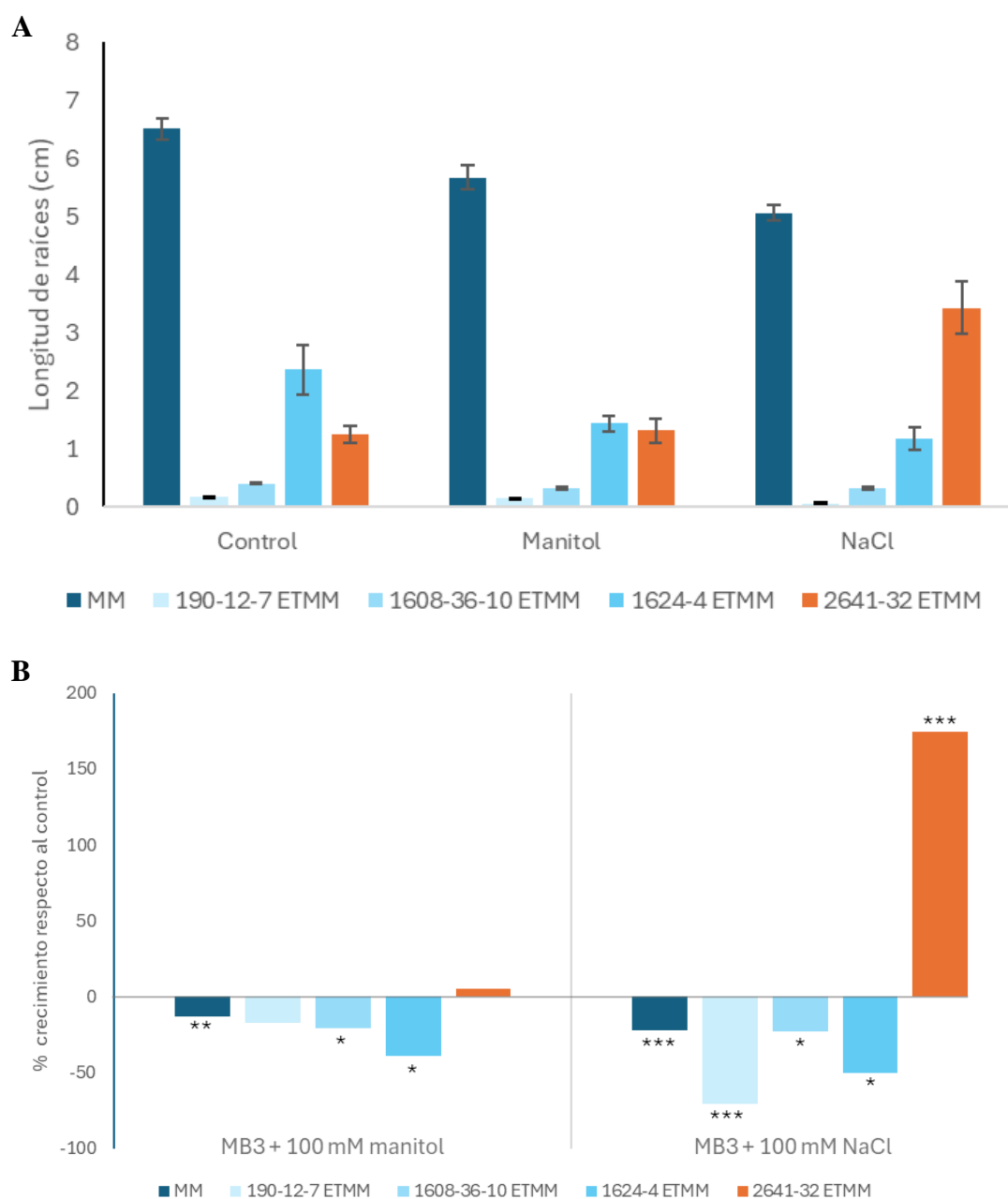


Figura 24. a) Longitud de las raíces de las diferentes líneas mutantes de raíz y del control (MM) a los 30 días en las diferentes condiciones estudiadas. Las barras representan el error estándar; b) Crecimiento relativo de la raíz en condiciones de estrés respecto a condiciones control (%) del control (MM) y de las líneas mutantes a los 30 días de cultivo. (Test T-student: *p < 0.05; **p < 0.01; *p < 0.005).**

Para corroborar este interesante resultado y mejorar el fenotipado frente a estrés salino, se volvió a analizar el comportamiento del mutante 2641 ampliando el número de condiciones de estrés salino. En esta ocasión, tras el cultivo de nuevas semillas y la clonación de los ápices meristemáticos en tres medios diferentes: MB3, MB3 75 mM de sal y 100 mM de sal se analizó la longitud de las raíces adventicias. Se corroboró que la línea 2641 ET MM en sal presentaba un desarrollo tanto aéreo como radicular ligeramente superior al de la línea mutante en condiciones control (Figura 25).



Figura 25. Fenotipo de la raíz y desarrollo aéreo de la línea 2641 ET MM a los 60 días. Las plantas control (WT) y mutantes (M) están clonadas en tres medios diferentes, MB3, MB3 + 75 mM de sal y MB3 + 100 mM de sal. Las escalas representan 1 cm.

Tras dejar las plantas 60 días en dichas condiciones, se volvió a medir la longitud de las raíces (Figura 26) y se observó de nuevo como las raíces aumentaban su desarrollo conforme aumentaba el contenido de NaCl en el medio de cultivo. Además, pese a las diferencias significativas que se observan en este parámetro entre WT y mutante sin sal y con bajas concentraciones de NaCl, en la condición de NaCl 100 mM el desarrollo no mostraba ninguna diferencia.

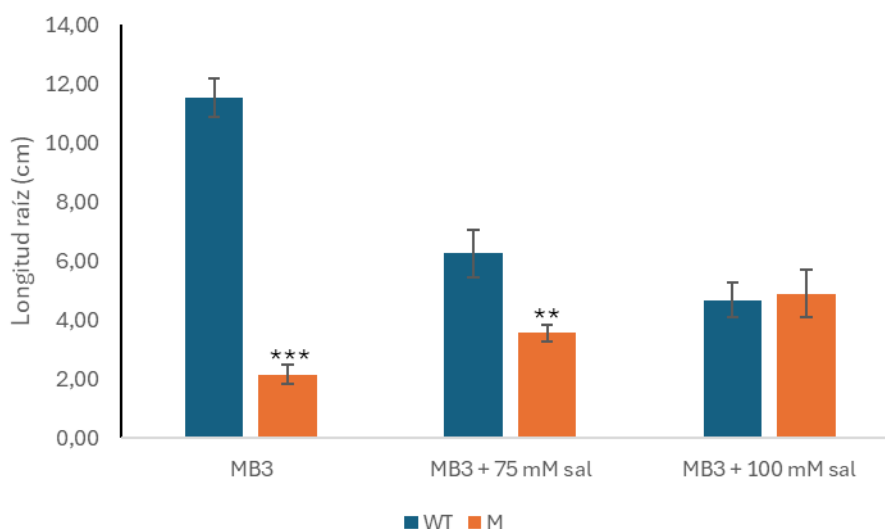


Figura 26. Longitud de las raíces de la línea 2641 ET MM. Se muestran la comparación de las medias de la longitud de las raíces entre plantas control (WT) y mutantes (M) en tres condiciones diferentes. Las barras representan el error estándar (Test T-student: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.005$).

Finalmente, se puede afirmar que el NaCl revierte el fenotipo mutante de la línea mutante 2641 ET MM, llegando incluso a presentar un desarrollo radicular prácticamente idéntico al del control en presencia de sal a altas concentraciones de sal. Además, aparte de incrementarse la longitud de la raíz, también se da una mejora en el desarrollo de la parte aérea. Por todo ello, se puede concluir que el mutante 2641 muestra cómo es posible que ciertos mutantes reviertan dicho fenotipo ante condiciones adversas, como es el caso del estrés salino, experimentando por tanto un correcto desarrollo.

5.3.2. Mutantes de parte aérea

Para analizar la respuesta de los mutantes de parte aérea ante estrés salino y estrés hídrico, se esterilizaron, germinaron y se cultivaron en MG y MG suplementado con 100 mM de NaCl 40 semillas de cada línea analizada. Las plantas se dejaron en dichas condiciones y se analizó su fenotipo al paso de 7, 15, 21 y 30 días (Tabla 8).

Tabla 8. Líneas de mutantes de parte aérea analizadas en este proyecto.

Línea	Fenotipo mutante en MB3	Fenotipo mutante en NaCl
15 GUS MM	Hojas cloróticas	Aparición más lenta del fenotipo albino y mayor aérea foliar.
35 ET MM	Hojas cloróticas	Igual que en condiciones control
1275 ET MM	Hojas albinas	Igual que en condiciones control
1308 ET MM	Hojas albinas	Igual que en condiciones control
1471 ET MM	Hojas cloróticas	Igual que en condiciones control
2486 ET MM	Hojas cloróticas	Igual que en condiciones control
2660 ET MM	Hojas cloróticas	Igual que en condiciones control

De las líneas analizadas, todas a excepción de la 15 GUS MM presentaron un fenotipo similar o más afectado ante las condiciones salinas que en condiciones control (Figura 27). Por el contrario, en el caso de la línea 15 GUS MM, a los 7 días no se observaba el fenotipo mutante en aquellas plantas cultivadas en medio MG suplementado con 100 mM de NaCl (Figura 27), lo que indicaba cierta reversión del fenotipo mutante debido a la sal. Debido a ello, se realizó un seguimiento en condiciones *in vitro* y un tratamiento de sal *in vivo*, para observar la respuesta del mutante a la sal en ambas situaciones.

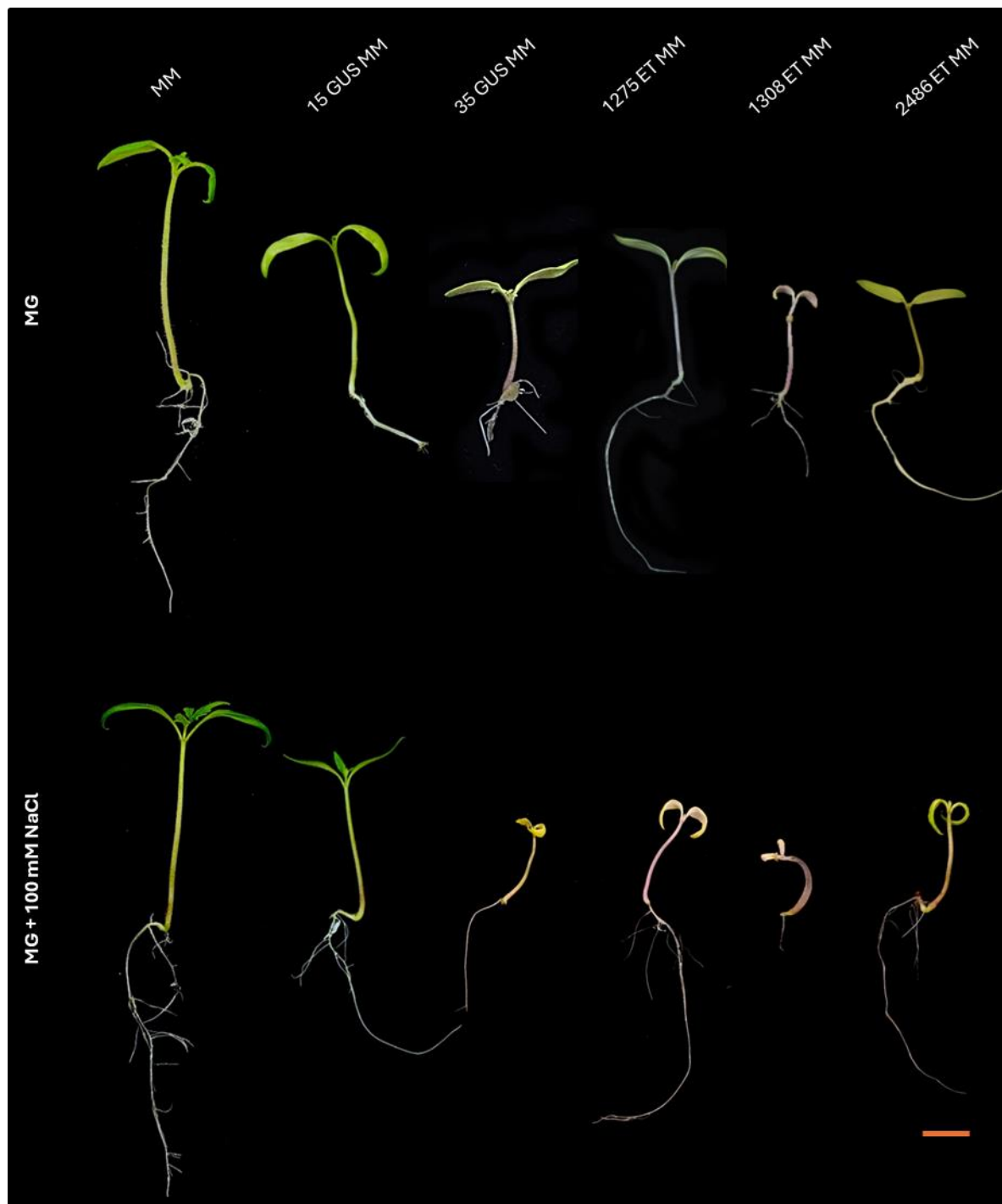


Figura 27. Fenotipos de varias línea mutantes analizadas. En la imagen se observan plántulas control (MM) y mutantes en medio MG (arriba) y en medio MG suplementado con 100 mM de NaCl (abajo). La escala representa 1 cm.

Respecto al tratamiento de sal *in vivo*, se sembraron varias semillas directamente en sustrato, dejando el tiempo necesario hasta que se pudieran distinguir las plantas WT de las mutantes y estas últimas tuvieran unos 3 cm de altura. En dicho punto, se comenzó con el tratamiento de sal. *In vivo* las plantas mutantes, tanto tratadas con sal como sin tratar, presentaron hojas poco desarrolladas y cloróticas que, al paso de pocos días, se mostraban secas. A los 30 días de la siembra, las plantas mutantes tratadas con sal y sin tratar estaban muertas. Por otro lado, en condiciones *in vitro*, pasados veinte días se observó que la planta mutante en condiciones control presentaba un fenotipo próximo al albino como ya se había descrito previamente. En cambio, la plántula mutante en condiciones con sal empezaba a manifestar, de manera muy sutil, el fenotipo clorótico en los bordes los cotiledones (Figura 28A). Después de un mes y medio, la plántula con sal mantenía un mejor desarrollo que la planta mutante en condiciones control. Esto se observaba en diferentes parámetros como un mayor número de hojas expandidas y una menor clorosis (Figura 28B).

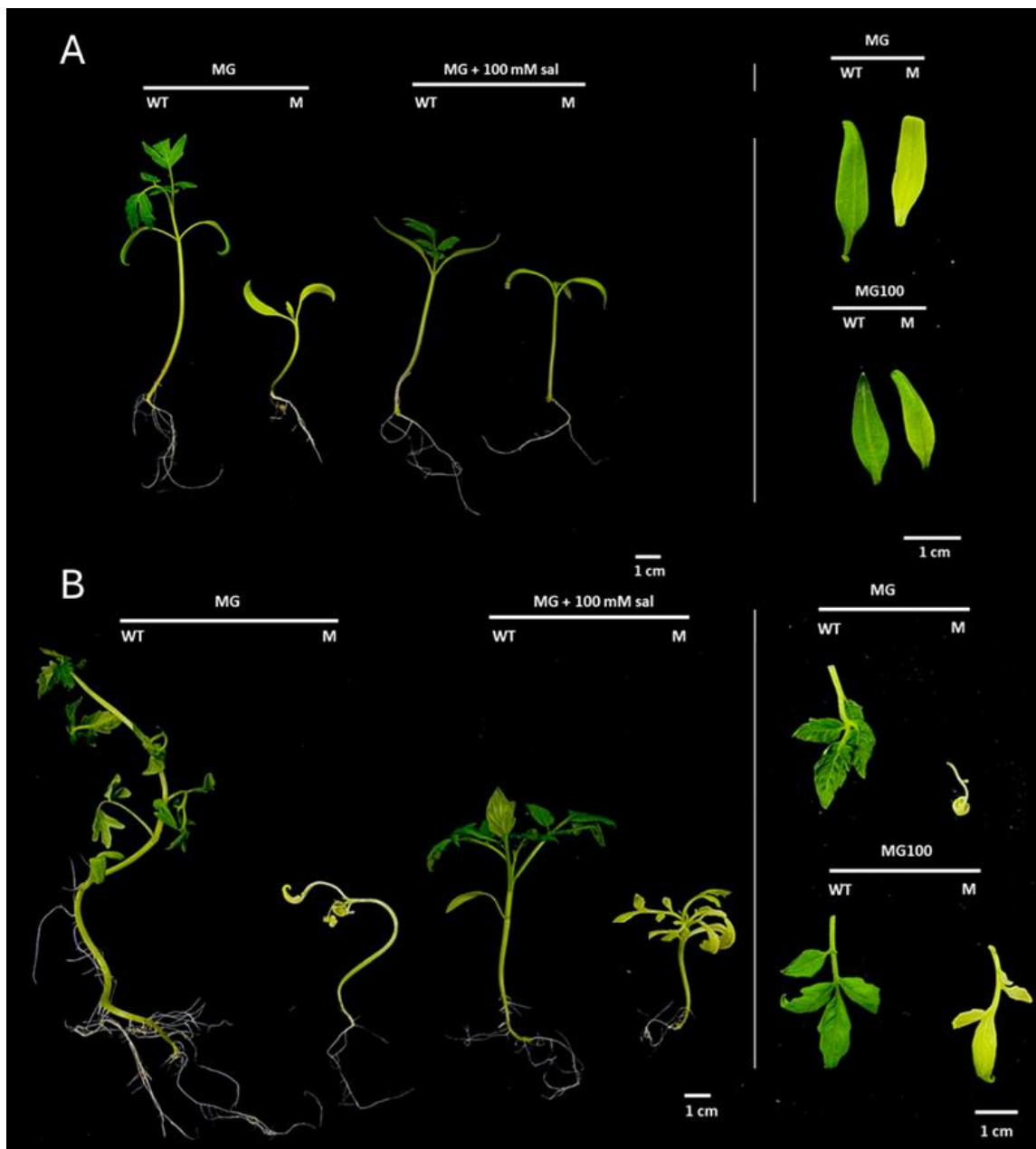


Figura 28. Fenotipo de la línea 15 GUS MM a los 20 días (A) y a los 45 días (B). Se analizó el fenotipo tanto de plántulas control (WT) como de mutantes (M) cultivadas en condiciones control (MG) y con 100 mM de sal (MG100). En la parte izquierda de la figura se observan las plántulas y en la parte derecha los cotiledones (A) u hojas (B) de dichas plántulas.

Además, las plantas mutantes en condiciones de sal mostraban un mayor grosor del tallo, por lo que se procedió a analizar el peso fresco y seco, tanto de la parte aérea como de la parte radicular. Tanto en el peso del tallo como en el de la raíz se observa que el WT baja cuando se le aplica estrés mientras que el del mutante o se mantiene o baja ligeramente, corroborando lo observado de forma cualitativa (Figura 29).

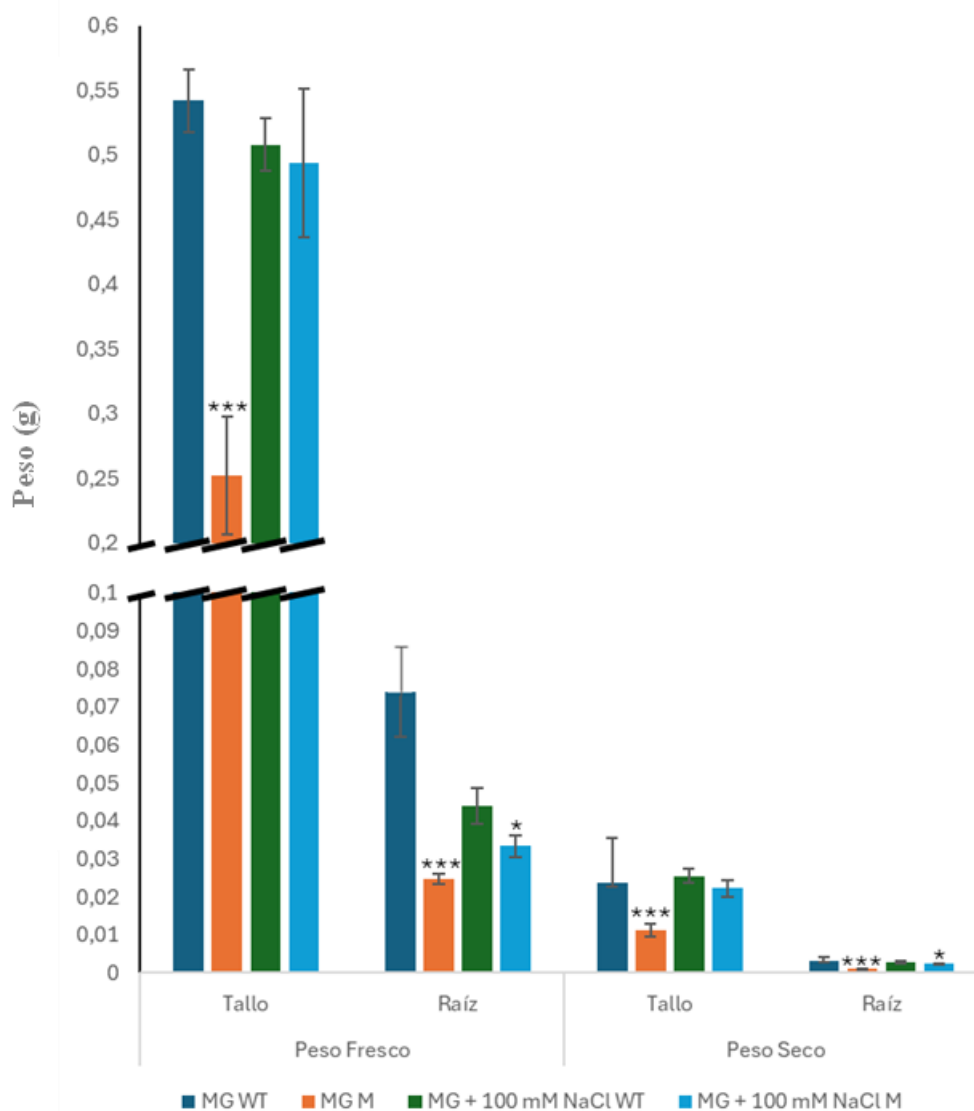


Figura 29. Comparación de peso fresco (izq) y seco (dcha) de la parte aérea (tallo) y parte radicular (raíz) entre la WT y la línea 15 GUSMM. Las plantas controles (WT) y mutantes (M) fueron cultivadas tanto en medio MG como en medio MG suplementado con 100 mM de sal. Las barras representan el error estándar (Test T-student: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.005$)

Para acabar, se puede concluir que el NaCl revierte el fenotipo mutante de la línea mutante 15 GUS MM, retardando la aparición de los primeros rasgos mutantes y evitando un empeoramiento del desarrollo foliar al mejorar en gran medida el desarrollo de la parte aérea, aumentando la biomasa y su estado general. Además, este efecto de normalización con la presencia de la sal se produce también en la raíz del mutante. De este modo, el mutante 15 GUSMM supone, al igual que el mutante 2641 ET MM, otro ejemplo de reversión del fenotipo mutante, gracias a una condición adversa, en este caso, el estrés salino. La identificación de los genes responsables de estas alteraciones nos permitirá profundizar en los mecanismos biológicos implicados.

6. Discusión

6.1. Protocolo de transformación para *S. pennellii*

Solanum pennellii es una especie silvestre relacionada con tomate que presenta una gran tolerancia al estrés hídrico y salino, lo que ha hecho que se utilice tanto en estudios básicos como en aproximaciones aplicadas relacionadas con la tolerancia a estos estreses. Para alcanzar dicho objetivo, la mutagénesis insercional puede ser una de las mejores herramientas en la búsqueda de genes de tolerancia al estrés salino e hídrico en *S. pennellii*. La identificación de estos genes podría ayudar a la mejora biotecnológica de una especie como tomate que se ve sometida a estos estreses de forma habitual.

Para poder ser llevada a cabo un programa de mutagénesis en *S. pennellii* es necesario ser capaces de transformar dicha especie con *Agrobacterium*. En trabajos previos se ha demostrado la posibilidad de obtener plantas transgénicas de *S. pennellii* como el trabajo con *Agrobacterium rhizogenes* (Ron et al., 2014) o con *Agrobacterium tumefaciens* (Atarés et al., 2011; Gisbert C. et al., 1999; Kroumova, A. B., & Wagner, G. J. 2009). En nuestro grupo hemos obtenido colecciones de plantas transgénicas de las accesiones de *S. pennellii* PE47, LA 0716 y 20164 (Atarés et al., 2011). Sin embargo, estas líneas no produjeron descendencia por autofecundación, por lo que cualquier intento de llevar a cabo un programa de mutagénesis insercional era poco efectivo al limitar el estudio a las mutaciones dominantes y no poder analizar las mutaciones recesivas, las cuales suelen ser más comunes. Es por ello por lo que intentamos la transformación de la accesión LA2657.

Tras aplicar el protocolo de transformación preestablecido en otras accesiones de *S. pennellii* en la accesión LA2657 y observando los resultados obtenidos (Figuras 15 y 20), se puede confirmar que en el desarrollo del presente trabajo se obtuvo un protocolo que permitiera la transformación de *S. pennellii* LA2657, tal y como se había conseguido en estudios previos del grupo con otras accesiones de *S. pennellii* (Atarés et al., 2011). Pese a los problemas sufridos durante este trabajo como la aparición del fenotipo albino y la necrosis en dos de las cuatro líneas probadas, se han obtenido plantas transgénicas en esta accesión por lo que podremos continuar trabajando con ella en el futuro. En ese caso nos centraremos en mejorar el sistema de selección ya que la tasa de escapes ha sido más alta de lo habitual, así como el de regeneración para que la proporción de plantas diploides sea superior a la observada. Por último, destacar que las plantas transgénicas obtenidas se podrán utilizar siempre que la línea 12 de la que proceden sea acigota para la mutación albina. Se está en proceso de conocer esta información ya que se ha cultivado en el invernadero esa y el resto de las líneas para obtener semilla de autofecundación.

6.2. Identificación de nuevos mutantes en condiciones de estrés salino

La generación de una colección de líneas T-DNA de *Solanum lycopersicum* cv. MoneyMaker es una de las principales tareas en el grupo de investigación, donde ya se disponen de más de 7000 líneas T-DNA y se han identificado más de 650 mutantes. De este modo, tras obtener las líneas T-DNA, se lleva a cabo un cribado para identificar qué líneas presentan algún fenotipo mutante. En este trabajo se ha analizado una colección de líneas T-DNA para intentar identificar alguna con fenotipo mutante cuando se cultivan semillas en condiciones de estrés salino. En nuestro grupo tenemos una eficacia de identificación de mutantes de alrededor del 10% cuando se analiza el programa de mutagénesis insercional en su conjunto. En el caso de este trabajo, al cultivar semillas en medio de germinación con NaCl se pueden identificar gran cantidad de alteraciones: germinación, desarrollo temprano,

enraizamiento embrionario, albinismo, clorosis, letalidad,... y, por supuesto, tolerancia o sensibilidad al estrés salino. Por tanto, la identificación de un mutante entre las 25 líneas analizadas (4%) se puede considerar como un resultado esperable.

Respecto a la línea 3263 ET MM, el menor desarrollo de su raíz primaria y el engrosamiento de la región basal del hipocótilo (Figuras 21 y 22) parece ser resultado de una respuesta hipersensible a la sal, al igual que lo observado en otros mutantes del grupo (Sánchez Martín-Sauceda, 2016). El desarrollo de la planta axénica sin sal está ligeramente afectado por lo que no puede considerarse un mutante que únicamente tenga alterada su respuesta frente a estrés salino. Sin embargo, las pruebas obtenidas en este trabajo indican que la alteración podría estar relacionada con la respuesta a estrés. Además, el análisis genético demostró como el mutante respondía para una herencia monogénica recesiva, producida por un solo inserto de T-DNA y en el cual no podía descartarse la cosegregación entre el fenotipo mutante y el inserto.

6.3. Fenotipado de mutantes de desarrollo frente a estrés salino e hídrico

El análisis del comportamiento ante condiciones de estrés hídrico y salino de mutantes previamente identificados en el grupo es de gran interés al poder establecer una relación entre dichos estreses y el gen afectado de la línea mutante. Aunque pueda parecer contraproducente el someter líneas mutantes, que ya tienen algún defecto en algún carácter del desarrollo, a unas condiciones desfavorables, existen muchos ejemplos en la literatura de interacciones entre caracteres de desarrollo y tolerancia a estreses. El ejemplo más evidente podría ser el efecto que puede tener una planta con mayor desarrollo radicular en su tolerancia a la sequía. Con esta idea se han analizado diferentes mutantes del desarrollo frente a estrés hídrico y salino. Pese a que la mayoría de ellos no han mostrado un fenotipo interesante ya que se comportaban de forma similar al WT se han identificado dos líneas cuyo fenotipo mutante revierte gracias a la presencia de sal.

6.3.1. Mutantes de raíz

En el caso de mutantes de raíz, se analizaron cuatro líneas. Las líneas 190 ET MM, 1608 ET MM y 1629 ET MM mostraron un fenotipo radicular más dañado por la presencia de sal (Figuras 24 y 25), lo esperado según lo observado en otros estudios del impacto de la sal y la sequía en el desarrollo radicular (Julkowska et al., 2014; Yamaguchi & Sharp, 2010). Sin embargo, la línea 2641 ET MM presentó una mayor elongación de sus raíces por la presencia de la sal (Figuras 22 y 23).

Al medir la longitud radicular en condiciones control y de estrés (MB3, MB3 + 75 mM de sal y MB3 + 100 mM de sal), se observó que las raíces del mutante ven favorecido su desarrollo conforme aumenta la concentración de NaCl, justo lo contrario que le pasa al WT (Figura 24). Este efecto tan curioso ya se había visto en otro mutante del grupo. El mutante *res* es un mutante de raíz que en condiciones control presenta malformaciones en la raíz que impiden su correcto desarrollo. Ante la presencia de sal en el medio de cultivo, desaparecen las alteraciones morfológicas de las raíces y se restaura la estructura celular, lo que permite la elongación de las raíces (García-Abellan et al., 2015). En el caso de la línea 2641 ET MM, no se observan malformaciones tan severas en la raíz, pero sí un efecto de normalización similar al del mutante *res* en el que la sal activa la cascada de regulación del ácido jasmónico al incrementar la concentración de las ROS (Pedranzani et al., 2003), lo que produce una reversión o mejora del fenotipo mutante.

Finalmente, durante los análisis de esta línea se demostró que no había cosegregación entre el fenotipo mutante y un inserto de T-DNA con el gen *nptIII* funcional. Debido a ello, se estableció que

este fenotipo viene producido por la variación somaclonal. Los trabajos de identificación del gen responsable de este mutante ya se han iniciado y esperamos en breve conocer cuál es el gen responsable para poder abordar nuevos experimentos.

6.3.2. Mutantes de parte aérea

En el caso de casi todos los mutantes de la parte aérea, afectados por albinismo o clorosis, su desarrollo se vio empeorado por la presencia de la sal en el medio como era de esperar (Figura 29). Sin embargo, la línea 15 GUS MM mejoró en presencia de sal, tardando el doble de tiempo en presentar el fenotipo albino (Figuras 28 y 29). Este hecho es bastante curioso, ya que uno de los primeros efectos de la sal es el inicio del desacople del sistema fotosintético y la reducción de la síntesis de clorofila, lo que explica la respuesta a la sal vista en el resto de los mutantes (Khavari-Nejad & Mostofi, 1998; Liu et al., 2015). Sin embargo, la sal provoca que los cotiledones y hojas del mutante 15 GUS MM permanezcan más tiempo verde, lo que indica una mayor conservación de los niveles de clorofila.

Este comportamiento de mejora del desarrollo en condiciones salinas se ha visto también en plantas halófitas. Así, Redondo-Gómez et al. (2010) observaron cómo *Arthrocnemum macrostachyum* es capaz de incrementar su desarrollo y tasa fotosintética a altas concentraciones de sal. Se ha identificado un comportamiento similar al del 15 GUS MM. Mittova et al. (2002), que demostró cómo en el caso de *S. pennellii*, al ser sometido a altas concentraciones de sal, el estrés salino produjo una mejora en la defensa antioxidante de los cloroplastos, protegiendo al sistema fotosintético/clorofila durante un tiempo mayor. De este modo, en el caso de la línea 15 GUS MM, aunque aún no se sepa cuál es el gen afectado, uno de los mecanismos alterados podría estar relacionado con lo observado en el trabajo anterior.

Por otro lado, además de evitar la aparición del fenotipo albino y presentar un número mayor de hojas expandidas y en mejores condiciones, las plantas mutantes presentaron una mayor biomasa radicular (Figura 30). Futuros estudios con plantas injertadas podrían ayudar a esclarecer las relaciones entre la parte aérea y las raíces en este mutante. Al igual que en el mutante anterior, actualmente se está llevando a cabo el trabajo de identificar el gen responsable de este mutante.

7. Conclusiones

Tras realizar los estudios que componen este trabajo de fin de máster se obtienen las siguientes conclusiones:

- Se ha conseguido establecer un protocolo de transformación para *Solanum pennellii* ac. LA2657. La detección de una mutación albina en esta accesión dificulta el uso de la misma. Se van a identificar plantas acigotas para la mutación para utilizarla en los futuros experimentos de transformación.
- Se han obtenido las primeras líneas transgénicas de la accesión LA2657 de *S. pennellii*. Hasta el momento no se ha conseguido obtener frutos de esta accesión. Tras la obtención de semillas TG2 se iniciará la identificación de nuevos mutantes en las líneas T-DNA obtenidas.
- Se ha realizado el escrutinio de una colección de líneas T-DNA de tomate y se ha identificado un nuevo mutante en la línea 3263 ET MM. Este mutante presenta ciertas alteraciones en condiciones control, aunque donde se observa mayores diferencias es en su crecimiento en condiciones salinas. El mutante es monogénico recesivo, tiene un inserto de T-DNA y no se puede descartar que exista cosegregación entre el inserto y el fenotipo mutante.
- El tratamiento de estrés salino e hídrico en mutantes de raíz y de menor contenido en clorofila (clorosis y albinismo) ha permitido la identificación de dos mutantes con un comportamiento interesante. El mutante 2641 ET MM que presenta un menor desarrollo radicular, normaliza su desarrollo con altas concentraciones de sal. Por otra parte, el mutante 15 GUS MM de fenotipo clorótico mejora su desarrollo en presencia de NaCl. Ambos mutantes están siendo analizados para conocer cuál es el gen responsable de dichas alteraciones.

8. Bibliografía

- Abdala, G., Miersch, O., Kramell, R., Vigliocco, A., Agostini, E., Forchetti, G., & Alemano, S. (2003). Jasmonate and octadecanoid occurrence in tomato hairy roots. Endogenous level changes in response to NaCl. *Plant Growth Regulation*, 40(1), 21-27. <https://doi.org/10.1023/A:1023016412454>
- Ashraf, M., & Harris, P. (2005). Stress environments and their impact on crop production. In *Abiotic Stresses* (pp. 25-40). CRC Press.
- Atarés, A., Moyano, E., Morales, B., Schleicher, P., García-Abellán, J. O., Antón, T.,...Pineda, B. (2011). An insertional mutagenesis programme with an enhancer trap for the identification and tagging of genes involved in abiotic stress tolerance in the tomato wild-related species *Solanum pennellii*. *Plant Cell Reports*, 30(10), 1865-1879. <https://doi.org/10.1007/s00299-011-1094-y>
- Azeem, M., Pirjan, K., Qasim, M., Mahmood, A., Javed, T., Muhammad, H.,...Rahimi, M. (2023). Salinity stress improves antioxidant potential by modulating physio-biochemical responses in *Moringa oleifera* Lam. *Scientific Reports*, 13(1), 2895. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-29954-6>
- Bai, Y., & Lindhout, P. (2007). Domestication and Breeding of Tomatoes: What have We Gained and What Can We Gain in the Future? *Annals of Botany*, 100(5), 1085-1094. <https://doi.org/10.1093/aob/mcm150>
- Bailey-Serres, J., Parker, J. E., Ainsworth, E. A., Oldroyd, G. E. D., & Schroeder, J. I. (2019). Genetic strategies for improving crop yields. *Nature*, 575(7781), 109-118. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1679-0>
- Bergougnoux, V. (2014). The history of tomato: From domestication to biopharming. *Biotechnology Advances*, 32(1), 170-189. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2013.11.003>
- Bolger, A., Scossa, F., Bolger, M. E., Lanz, C., Maumus, F., Tohge, T.,...Fernie, A. R. (2014). The genome of the stress-tolerant wild tomato species *Solanum pennellii*. *Nature Genetics*, 46(9), 1034-1038. <https://doi.org/10.1038/ng.3046>
- Bridgen, M. P., Van Houtven, W., & Eeckhaut, T. (2018). Plant Tissue Culture Techniques for Breeding. In J. Van Huylenbroeck (Ed.), *Ornamental Crops* (pp. 127-144). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-90698-0_6
- Cano, E. A., Pérez-Alfocea, F., Moreno, V., Caro, M., & Bolarín, M. C. (1998). Evaluation of salt tolerance in cultivated and wild tomato species through *in vitro* shoot apex culture. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 53(1), 19-26. <https://doi.org/10.1023/A:1006017001146>
- Carbonell, A., Fahlgren, N., Mitchell, S., Cox Jr, K. L., Reilly, K. C., Mockler, T. C., & Carrington, J. C. (2015). Highly specific gene silencing in a monocot species by artificial microRNAs derived from chimeric mi precursors. *The Plant Journal*, 82(6), 1061-1075. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/tpj.12835>
- Duan, C. G., Zhu, J. K., & Cao, X. Retrospective and perspective of plant epigenetics in China. (1673-8527 (Print)).
- Espinosa-Leal, C. A., Puente-Garza, C. A., & García-Lara, S. (2018). *In vitro* plant tissue culture: means for production of biological active compounds. *Planta*, 248(1), 1-18. <https://doi.org/10.1007/s00425-018-2910-1>
- Farber, M., Attia, Z., & Weiss, D. (2016). Cytokinin activity increases stomatal density and transpiration rate in tomato. *Journal of Experimental Botany*, 67(22), 6351-6362. <https://doi.org/10.1093/jxb/erw398>

- Friedman, M. (2013). Anticarcinogenic, cardioprotective, and other health benefits of tomato compounds lycopene, α -tomatine, and tomatidine in pure form and in fresh and processed tomatoes. *Journal of agricultural and food chemistry*, 61(40), 9534-9550.
- Galvan-Ampudia, C. S., & Testerink, C. (2011). Salt stress signals shape the plant root. *Current Opinion in Plant Biology*, 14(3), 296-302. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.pbi.2011.03.019>
- Garcia-Abellan, J. O., Fernandez-Garcia, N., Lopez-Berenguer, C., Egea, I., Flores, F. B., Angosto, T.,...Bolarin, M. C. (2015). The tomato res mutant which accumulates JA in roots in non-stressed conditions restores cell structure alterations under salinity. *Physiologia Plantarum*, 155(3), 296-314. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/ppl.12320>
- Gavassi, M. A., Monteiro, C. C., Campos, M. L., Melo, H. C., & Carvalho, R. F. (2017). Phytochromes are key regulators of abiotic stress responses in tomato. *Scientia Horticulturae*, 222, 126-135. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.scienta.2017.04.035>
- Ge, T., Sui, F., Bai, L., Tong, C., & Sun, N. (2012). Effects of water stress on growth, biomass partitioning, and water-use efficiency in summer maize (*Zea mays* L.) throughout the growth cycle. *Acta Physiologiae Plantarum*, 34(3), 1043-1053. <https://doi.org/10.1007/s11738-011-0901-y>
- Gisbert, C., Arrillaga, I., Roig, L. A., & Moreno, V. (1999). Acquisition of a collection of *Lycopersicon pennellii* (Corr. D'Arcy) transgenic plants with uidA and nptII marker genes. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 74(1), 105-109. <https://doi.org/10.1080/14620316.1999.11511081>
- Grime, J. (1979). Primary strategies in plants. Transactions of the Botanical Society of Edinburgh,
- Hauser, F., & Horie, T. (2010). A conserved primary salt tolerance mechanism mediated by HKT transporters: a mechanism for sodium exclusion and maintenance of high K⁺/Na⁺ ratio in leaves during salinity stress. *Plant, Cell & Environment*, 33(4), 552-565. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2009.02056.x>
- Hazman, M., & Brown, K. M. (2018). Progressive drought alters architectural and anatomical traits of rice roots. *Rice*, 11(1), 62. <https://doi.org/10.1186/s12284-018-0252-z>
- Hoque, M. A., Banu, M. N. A., Nakamura, Y., Shimoishi, Y., & Murata, Y. (2008). Proline and glycinebetaine enhance antioxidant defense and methylglyoxal detoxification systems and reduce NaCl-induced damage in cultured tobacco cells. *Journal of Plant Physiology*, 165(8), 813-824. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jplph.2007.07.013>
- Isayenkov, S. V., & Maathuis, F. J. M. (2019). Plant Salinity Stress: Many Unanswered Questions Remain [Review]. *Frontiers in Plant Science*, 10. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00080>
- Johnson, A. A. T., Hibberd, J. M., Gay, C., Essah, P. A., Haseloff, J., Tester, M., & Guiderdoni, E. (2005). Spatial control of transgene expression in rice (*Oryza sativa* L.) using the GAL4 enhancer trapping system. *The Plant Journal*, 41(5), 779-789. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2005.02339.x>
- Julkowska, M. M., Hoefsloot, H. C. J., Mol, S., Feron, R., de Boer, G.-J., Haring, M. A., & Testerink, C. (2014). Capturing Arabidopsis Root Architecture Dynamics with root-fit Reveals Diversity in Responses to Salinity. *Plant Physiology*, 166(3), 1387-1402. <https://doi.org/10.1104/pp.114.248963>
- Karan, R., DeLeon, T., Biradar, H., & Subudhi, P. K. (2012). Salt Stress Induced Variation in DNA Methylation Pattern and Its Influence on Gene Expression in Contrasting Rice Genotypes. *PLOS ONE*, 7(6), e40203. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0040203>

- Khavari-Nejad, R. A., & Mostofi, Y. (1998). Effects of NaCl on photosynthetic pigments, saccharides, and chloroplast ultrastructure in leaves of tomato cultivars. *Photosynthetica*, 35(1), 151-154. <https://doi.org/10.1023/A:1006846504261>
- Kondo, M., Murty, M. V. R., & Aragonés, D. V. (2000). Characteristics of root growth and water uptake from soil in upland rice and maize under water stress. *Soil Science and Plant Nutrition*, 46(3), 721-732. <https://doi.org/10.1080/00380768.2000.10409137>
- Kranner, I., Minibayeva, F. V., Beckett, R. P., & Seal, C. E. (2010). What is stress? Concepts, definitions and applications in seed science. *New Phytologist*, 188(3), 655-673. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2010.03461.x>
- Krysan, P. J., Young, J. C., & Sussman, M. R. (1999). T-DNA as an Insertional Mutagen in Arabidopsis. *The Plant Cell*, 11(12), 2283-2290. <https://doi.org/10.1105/tpc.11.12.2283>
- Kumar, A., Kumar, V., Gull, A., & Nayik, G. A. (2020). Tomato (*Solanum Lycopersicon*). In G. A. Nayik & A. Gull (Eds.), *Antioxidants in Vegetables and Nuts - Properties and Health Benefits* (pp. 191-207). Springer Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-15-7470-2_10
- Kroumova, A. B., & Wagner, G. J. (2009). Pathways for synthesis, and possibilities for genetic modification of sugar ester acyl groups produced by trichomes of solanaceous species. *Gen Appl Plant Physiol*, 35, 95-110.
- Li, S., An, Y., Hailati, S., Zhang, J., Cao, Y., Liu, Y.,... Yang, P. (2019). Overexpression of the Cytokinin Oxidase/dehydrogenase (CKX) from *Medicago sativa* Enhanced Salt Stress Tolerance of Arabidopsis. *Journal of Plant Biology*, 62(5), 374-386. <https://doi.org/10.1007/s12374-019-0141-z>
- Litskas, V. D., Migeon, A., Navajas, M., Tixier, M.-S., & Stavrinides, M. C. (2019). Impacts of climate change on tomato, a notorious pest and its natural enemy: small scale agriculture at higher risk. *Environmental Research Letters*, 14(8), 084041. <https://doi.org/10.1088/1748-9326/ab3313>
- Liu, H., Liu, J., Zhao, M.-M., & Chen, J.-S. (2015). Overexpression of ShCHL P in tomato improves seedling growth and increases tolerance to salt, osmotic, and oxidative stresses. *Plant Growth Regulation*, 77(2), 211-221. <https://doi.org/10.1007/s10725-015-0054-x>
- López Marín, L. M. (2017). Manual técnico del cultivo del tomate *Solanum lycopersicum*. In: Instituto Nacional de Innovación y Transferencia en Tecnología Agropecuaria
- Meissner, R., Chague, V., Zhu, Q., Emmanuel, E., Elkind, Y., & Levy, A. A. (2000). A high throughput system for transposon tagging and promoter trapping in tomato. *The Plant Journal*, 22(3), 265-274. <https://doi.org/https://doi.org/10.1046/j.1365-313x.2000.00735.x>
- Messmer, M., Wilbois, K., Baier, C., Schäfer, F., Arncke, C., Drexler, D., & Hildermann, I. (2015). Técnicas de mejora vegetal: Una valoración desde la agricultura ecológica. *Editorial SEAE. Valencia, España*.
- Mittova, V., Tal, M., Volokita, M., & Guy, M. (2002). Salt stress induces up-regulation of an efficient chloroplast antioxidant system in the salt-tolerant wild tomato species *Lycopersicon pennellii* but not in the cultivated species. *Physiologia Plantarum*, 115(3), 393-400. <https://doi.org/https://doi.org/10.1034/j.1399-3054.2002.1150309.x>
- Muñoz-Sanz, J. V., Tovar-Méndez, A., Lu, L., Dai, R., & McClure, B. (2021). A Cysteine-Rich Protein, SpDIR1L, Implicated in S-RNase-Independent Pollen Rejection in the Tomato (*Solanum Section Lycopersicon*) Clade. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(23).
- Murashige, T., & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15(3).

- Nelissen, H., Sun, X.-H., Rymen, B., Jikumaru, Y., Kojima, M., Takebayashi, Y.,...Inzé, D. (2018). The reduction in maize leaf growth under mild drought affects the transition between cell division and cell expansion and cannot be restored by elevated gibberellic acid levels. *Plant Biotechnology Journal*, 16(2), 615-627. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/pbi.12801>
- Osakabe, Y., Osakabe, K., Shinozaki, K., & Tran, L.-S. P. (2014). Response of plants to water stress [Mini Review]. *Frontiers in Plant Science*, 5. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00086>
- Oshunsanya, S. O., Nwosu, N. J., & Li, Y. (2019). Abiotic Stress in Agricultural Crops Under Climatic Conditions. In M. K. Jhariya, A. Banerjee, R. S. Meena, & D. K. Yadav (Eds.), *Sustainable Agriculture, Forest and Environmental Management* (pp. 71-100). Springer Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-13-6830-1_3
- Pasqual, M., Soares, J., & Rodrigues, F. A. (2014). Tissue culture applications for the genetic improvement of plants. *Biotechnology and Plant Breeding: applications and approaches for developing improved cultivars*, 225, 157-199.
- Pedranzani, H., Racagni, G., Alemano, S., Miersch, O., Ramírez, I., Peña-Cortés, H.,...Abdala, G. (2003). Salt tolerant tomato plants show increased levels of jasmonic acid. *Plant Growth Regulation*, 41(2), 149-158. <https://doi.org/10.1023/A:1027311319940>
- Peralta, I. E., & Spooner, D. M. (2007). History, origin and early cultivation of tomato (Solanaceae). *Genetic improvement of solanaceous crops*, 2, 1-27.
- Peralta, I. E., Spooner, D. M., & Knapp, S. (2008). Taxonomy of wild tomatoes and their relatives (Solanum sect. Lycopersicoides, sect. Juglandifolia, sect. Lycopersicon; Solanaceae).
- Pérez-Martín, F., Yuste-Lisbona, F. J., Pineda, B., Angarita-Díaz, M. P., García-Sogo, B., Antón, T.,...Lozano, R. (2017). A collection of enhancer trap insertional mutants for functional genomics in tomato. *Plant Biotechnology Journal*, 15(11), 1439-1452. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/pbi.12728>
- Quintero, F. J., Ohta, M., Shi, H., Zhu, J.-K., & Pardo, J. M. (2002). Reconstitution in yeast of the Arabidopsis SOS signaling pathway for Na⁺ homeostasis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(13), 9061-9066.
- Razifard, H., Ramos, A., Della Valle, A. L., Bodary, C., Goetz, E., Manser, E. J.,...Caicedo, A. L. (2020). Genomic Evidence for Complex Domestication History of the Cultivated Tomato in Latin America. *Molecular Biology and Evolution*, 37(4), 1118-1132. <https://doi.org/10.1093/molbev/msz297>
- Reddy, A. R., Chaitanya, K. V., & Vivekanandan, M. (2004). Drought-induced responses of photosynthesis and antioxidant metabolism in higher plants. *Journal of Plant Physiology*, 161(11), 1189-1202. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jplph.2004.01.013>
- Redondo-Gómez, S., Mateos-Naranjo, E., Figueroa, M. E., & Davy, A. J. (2010). Salt stimulation of growth and photosynthesis in an extreme halophyte, *Arthrocnemum macrostachyum*. *Plant Biology*, 12(1), 79-87. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1438-8677.2009.00207.x>
- Romero Cortés, P. Y. (2018). Identificación y caracterización de mutantes afectados en el desarrollo foliar en líneas T-DNA de tomate.
- Ron, M., Kajala, K., Pauluzzi, G., Wang, D., Reynoso, M. A., Zumstein, K.,...Brady, S. M. (2014). Hairy Root Transformation Using *Agrobacterium rhizogenes* as a Tool for Exploring Cell Type-Specific Gene Expression and Function Using Tomato as a Model. *Plant Physiology*, 166(2), 455-469. <https://doi.org/10.1104/pp.114.239392>
- Saadi, S., Todorovic, M., Tanasijevic, L., Pereira, L. S., Pizzigalli, C., & Lionello, P. (2015). Climate change and Mediterranean agriculture: Impacts on winter wheat and tomato

- crop evapotranspiration, irrigation requirements and yield. *Agricultural Water Management*, 147, 103-115. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.agwat.2014.05.008>
- Sánchez López, J. (2017). *Generación de líneas T-DNA de tomate (Solanum lycopersicum) para la identificación de mutantes de inserción alterados en la morfogénesis y el desarrollo vegetal* Universitat Politècnica de València].
- Sánchez Martín-Sauceda, S. (2016). *Generación de mutantes de inserción de tomate cultivado y silvestre e identificación de genes implicados en procesos de desarrollo y tolerancia a estrés abiótico* Universitat Politècnica de València].
- Shahin, E. A. (1985). Totipotency of tomato protoplasts. *Theoretical and Applied Genetics*, 69(3), 235-240. <https://doi.org/10.1007/BF00662431>
- Shalata, A., Mittova, V., Volokita, M., Guy, M., & Tal, M. (2001). Response of the cultivated tomato and its wild salt-tolerant relative *Lycopersicon pennellii* to salt-dependent oxidative stress: The root antioxidative system. *Physiologia Plantarum*, 112(4), 487-494. <https://doi.org/https://doi.org/10.1034/j.1399-3054.2001.1120405.x>
- Shao, H.-B., Chu, L.-Y., Jaleel, C. A., & Zhao, C.-X. (2008). Water-deficit stress-induced anatomical changes in higher plants. *Comptes Rendus Biologies*, 331(3), 215-225. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.crv.2008.01.002>
- Sharma, A., Shahzad, B., Kumar, V., Kohli, S. K., Sidhu, G. P. S., Bali, A. S.,...Zheng, B. (2019). Phytohormones Regulate Accumulation of Osmolytes Under Abiotic Stress. *Biomolecules*, 9(7), 285. <https://www.mdpi.com/2218-273X/9/7/285>
- Singroha, G., Kumar, S., Gupta, O. P., Singh, G. P., & Sharma, P. (2022). Uncovering the Epigenetic Marks Involved in Mediating Salt Stress Tolerance in Plants [Review]. *Frontiers in Genetics*, 13. <https://doi.org/10.3389/fgene.2022.811732>
- Springer, P. S. (2000). Gene traps: tools for plant development and genomics. (1040-4651 (Print)).
- Sundaresan, V., Springer, P., Volpe, T., Haward, S., Jones, J. D., Dean, C.,...Martienssen, R. (1995). Patterns of gene action in plant development revealed by enhancer trap and gene trap transposable elements. *Genes & development*, 9(14), 1797-1810.
- The 100 Tomato Genome Sequencing, C., Aflitos, S., Schijlen, E., de Jong, H., de Ridder, D., Smit, S.,...Peters, S. (2014). Exploring genetic variation in the tomato (*Solanum section Lycopersicon*) clade by whole-genome sequencing. *The Plant Journal*, 80(1), 136-148. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/tpj.12616>
- Thorpe, T. A. (2007). History of plant tissue culture. *Molecular Biotechnology*, 37(2), 169-180. <https://doi.org/10.1007/s12033-007-0031-3>
- Verma, V., Ravindran, P., & Kumar, P. P. (2016). Plant hormone-mediated regulation of stress responses. *BMC Plant Biology*, 16(1), 86. <https://doi.org/10.1186/s12870-016-0771-y>
- Wang, D., He, D., Li, G., Gao, S., Lv, H., Shan, Q., & Wang, L. (2014). An efficient tool for random insertional mutagenesis: *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of the filamentous fungus *Aspergillus terreus*. *Journal of Microbiological Methods*, 98, 114-118. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.mimet.2014.01.007>
- Wang, J., Nan, N., Li, N., Liu, Y., Wang, T.-J., Hwang, I.,...Xu, Z.-Y. (2020). A DNA Methylation Reader–Chaperone Regulator–Transcription Factor Complex Activates OsHKT1;5 Expression during Salinity Stress. *The Plant Cell*, 32(11), 3535-3558. <https://doi.org/10.1105/tpc.20.00301>
- Wijerathna-Yapa, A., Ramtekey, V., Ranawaka, B., & Basnet, B. R. (2022). Applications of *In Vitro* Tissue Culture Technologies in Breeding and Genetic Improvement of Wheat. *Plants*, 11(17).

- Wu, C., Li, X., Yuan, W., Chen, G., Kilian, A., Li, J.,...Zhang, Q. (2003). Development of enhancer trap lines for functional analysis of the rice genome. *The Plant Journal*, 35(3), 418-427. <https://doi.org/https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.2003.01808.x>
- Xu, L., Najeeb, U., Naeem, M. S., Wan, G. L., Jin, Z. L., Khan, F., & Zhou, W. J. (2012). *In Vitro* Mutagenesis and Genetic Improvement. In S. K. Gupta (Ed.), *Technological Innovations in Major World Oil Crops, Volume 2: Perspectives* (pp. 151-173). Springer New York. https://doi.org/10.1007/978-1-4614-0827-7_6
- Yamaguchi, M., & Sharp, R. E. (2010). Complexity and coordination of root growth at low water potentials: recent advances from transcriptomic and proteomic analyses. *Plant, Cell & Environment*, 33(4), 590-603. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2009.02064.x>
- Zhang, J., Jia, W., Yang, J., & Ismail, A. M. (2006). Role of ABA in integrating plant responses to drought and salt stresses. *Field Crops Research*, 97(1), 111-119. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.fcr.2005.08.018>