



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA

Departamento de Biotecnología

Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas

**Mutagénesis insercional en tomate y
Solanum pennellii: Identificación de
mutantes de inserción alterados en el
desarrollo y la tolerancia a la salinidad**

TESIS DOCTORAL

**Presentada por:
PETER SCHLEICHER**

**Dirigida por:
Dr. ALEJANDRO ATARÉS HUERTA
Dr. VICENTE MORENO FERRERO**

Valencia, Marzo 2017

D. Vicente Moreno Ferrero, Doctor en Ciencias Biológicas y Catedrático de Genética del Departamento de Biotecnología, de la Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica y del Medio Natural de la Universidad Politécnica de Valencia y

D. Alejandro Atarés Huerta, Doctor Ingeniero Agrónomo y Profesor Contratado Doctor del Departamento de Biotecnología, de la Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica y del Medio Natural de la Universidad Politécnica de Valencia

CERTIFICAN que:

D. Peter Schleicher, Ingeniero Agrónomo, ha realizado bajo nuestra dirección el trabajo que, con el título: “Mutagénesis Insercional en tomate y *Solanum pennellii*: Identificación de mutantes de inserción alterados en el desarrollo y la tolerancia a la salinidad”, presenta para optar al grado de Doctor por la Universidad Politécnica de Valencia.

Para que así conste a los efectos académicos oportunos, firman el presente certificado en Valencia 3 de marzo de 2017.

Dr. Vicente Moreno Ferrero

Dr. Alejandro Atarés Huerta

Agradecimientos

Tanto mis padres, Truus y Toni, como mi hermano Robert y su familia se merecen ser mencionados en primer lugar porque participaron en este trayecto que culmina con la presentación de esta memoria y la defensa de mi tesis mucho antes de cortar el primer explante. Su confianza, respaldo, interés y amor desde lejos, pero siempre muy cerca, han sido el mayor apoyo durante estos años. Vielen Dank, liebe Familie, für die Unterstützung in all den Jahren!

A mis directores Vicente y Alejandro les agradezco la oportunidad de formar parte de su equipo, la fe en mí desde el principio y la paciencia demostrada hasta el final. Siempre estuvieron disponibles para compartir sus amplios conocimientos e ideas y para resolver cualquier duda y avanzar con el proyecto. Me enseñaron a planificar, organizar, observar, intentar, dudar, preguntar, repetir, redactar, en fin; trabajar de forma científica. Aunque no aparece como “director oficial”, Benito con su dedicación extraordinaria a la ciencia, fue casi igual de importante para la realización de este proyecto. Sigue siendo un amigo y un ejemplo excelente, una persona que vive para la investigación. Begoña con su extensa experiencia en el campo del cultivo *in vitro* fue una fuente inagotable de consejos y recomendaciones. Pero no solo eso, sino también una verdadera amiga. Siendo el motor principal para innumerables conversaciones, durante las comidas me ayudó a entender un poco mejor este mundo al sur de los Pirineos.

El Dr. Lozano y la Dra. Bolarín y sus grupos de investigación contribuyeron a mi trabajo aportando datos valiosos de sus respectivos campos de investigación, dando rigor a esta tesis. Les agradezco mucho su cooperación y su voluntad de compartir sus resultados.

Durante esos cuatro años tuve el placer de compartir las cabinas de flujo con una multitud de becarios, empezando con Yania y Rosa y terminando con Sibilla y Jorge S., teniendo el placer de conocer a personas de todo el mundo y disfrutando de su amistad. Dentro de este grupo de compañeros, Pilar y Géraldine ocupan sitios especiales. Pilar por ser muy diferente

y a la vez muy parecida a mí, quizás el motivo por el cual nuestra amistad fue tan íntima desde el inicio y persiste hasta hoy. Con Géraldine no solo estaba compartiendo espacio en el laboratorio, sino también un piso espectacular. Una vez superada la duda sobre la bondad de la idea de estar juntos dentro y fuera del trabajo, llegué a la conclusión de haber tomado una decisión muy buena. Diría que creamos un hogar muy especial durante más de dos años inolvidables.

Aunque yo firmo como autor de esta obra, no voy a olvidar que mi trabajo no hubiera sido posible sin la colaboración de muchas personas. Dentro de ellas destacan Jesús en el invernadero, Vicente Navarro en el laboratorio de agrónomos y Pilar en el del IBMCP. También agradezco a los evaluadores externos y al tribunal de la defensa su voluntad de entretenerse con mi trabajo y hacerme crecer con sus críticas y comentarios.

Mientras mis amig@s Jens, Steffi, Jörg, Nicole, Clemens, Neeke, Stephan, Nina y muchos más se encargaron de darme motivos para echar de menos mis orígenes y volver a Alemania; Jorge L., Aurora, Ricardo, María V., Vicente, Bárbara, Gaetano, Berta, Arlich, Elena, David y todos los que se me escapan ahora participaron en la creación de una nueva vida aquí.

He empezado los agradecimientos con mi familia en Alemania y soy muy afortunado por poder terminar este apartado con mi familia en España. Una chica muy amable se aseguró desde el principio que me oriento, pierdo y divierto en Valencia. Parece que llamé su atención desde el principio, pero yo, tonto como soy, tardé mucho en aceptar lo que ella estaba dispuesta a regalar. Gracias a su increíble paciencia las cosas salieron bien y Teresa se convirtió en mi querida esposa. Le agradezco su amor, su paciencia, su alegría, sus consejos, su respaldo y su voluntad de compartir su vida conmigo. Esta gratitud de aceptarme y quererme se extiende a sus padres Tere y Paco, su hermano Paquito y su novia Leti.

Muchas gracias por todo.

Índice general

Índice.....	I
Índice de figuras.....	V
Índice de tablas.....	VIII
Resúmenes.....	IX

Índice

1	Introducción	1
1.1	Origen y taxonomía del tomate	1
1.2	Características de una planta de tomate y algunos genes que las controlan	3
1.3	Importancia económica y científica del tomate	9
1.4	La mutagénesis insercional	13
1.4.1	Transposones.....	15
1.4.2	T-DNA	16
1.4.3	Vectores específicos para la identificación de genes	18
1.5	Los estreses abióticos: sequía y salinidad	23
1.5.1	Respuestas al estrés osmótico	27
1.5.2	Respuesta al estrés iónico	30
1.6	Programa de mutagénesis insercional en <i>S. pennellii</i>	34
2	Objetivos	39
3	Material y Métodos.....	41
3.1	Material vegetal	41
3.2	Obtención de plantas transgénicas	42
3.2.1	Técnicas básicas.....	42
3.2.2	Transformación genética de <i>S. pennellii</i>	44
3.2.3	Determinación del nivel de ploidía en las plantas regeneradas mediante citometría de flujo.....	47

3.2.4	Aclimatación y trasplante	48
3.2.5	Cultivo de plantas de <i>S. pennellii</i> en el invernadero y obtención de las descendencias	48
3.3	Evaluación de la tolerancia a la salinidad	50
3.3.1	Evaluación de la tolerancia al estrés salino <i>in vitro</i>	50
3.3.2	Evaluación de la tolerancia al estrés salino <i>in vivo</i>	52
3.4	Evaluación de la expresión del gen delator	53
3.5	Técnicas de microscopía	55
3.5.1	Fijación de las muestras e inclusión en parafina	55
3.5.2	Tinción con azul de anilina	56
3.5.3	Tinción con floroglucinol	56
3.6	Caracterización genética del fenotipo mutante	56
3.7	Determinación del número de insertos T-DNA	57
3.7.1	Estimación del número de insertos mediante técnicas de cultivo <i>in vitro</i>	57
3.7.2	Determinación del número de insertos T-DNA mediante análisis moleculares	58
3.8	Determinación de la cosegregación entre inserto T-DNA y fenotipo mutante	60
3.8.1	Estimación de la cosegregación mediante técnicas de cultivo <i>in vitro</i>	60
3.8.2	Determinación de la cosegregación mediante PCR	61
3.9	Clonación del gen etiquetado mediante Anchor-PCR	62
4	Resultados	65
4.1	Generación de líneas T-DNA de <i>Solanum pennellii</i>	65
4.2	Detección de mutantes hipersensibles a estrés salino	67
4.3	Evaluación de la tolerancia al estrés salino <i>in vitro</i>	68
4.3.1	Evaluación con ápices meristemáticos sin enraizar	69
4.3.2	Evaluación con ápices meristemáticos enraizados	71
4.3.3	Caracterización del mutante 4165 ETSP	74
4.3.4	Caracterización del mutante 515 ETSP	76
4.4	Evaluación de la tolerancia al estrés salino <i>in vivo</i> : sistema hidropónico pasivo	77

4.4.1	Evaluación a corto plazo de la colección de líneas T-DNA de <i>S. pennellii</i> mediante un sistema hidropónico pasivo.....	79
4.4.2	Evaluación a corto plazo mediante un sistema hidropónico pasivo de la colección de líneas T-DNA de tomate	85
4.5	Detección de mutantes del desarrollo en la colección de líneas T-DNA de <i>S. pennellii</i>	95
4.5.1	4196 ETSP	95
4.5.2	4166 ETSP	99
4.5.3	4025 ETSP	105
5	Discusión	115
5.1	Obtención de una colección de plantas transgénicas de <i>Solanum pennellii</i>	116
5.2	Sistemas para la detección de mutantes afectados en su tolerancia a la salinidad	121
5.2.1	El cultivo <i>in vitro</i> como herramienta para el escrutinio y evaluación de mutantes afectados en su tolerancia al estrés salino.....	123
5.2.2	Nuevo sistema de cultivo <i>in vivo</i> para el escrutinio y evaluación de mutantes afectados en su tolerancia a estrés salino	126
5.3	Implicaciones de las alteraciones observadas en la tolerancia a la salinidad	130
5.3.1	Efectos de la salinidad sobre el desarrollo de los órganos vegetativo aéreos.....	131
5.3.2	Efecto de la salinidad sobre el sistema radicular	132
5.3.3	Floración temprana	133
5.3.4	Producción de antocianinas	135
5.3.5	Hiperhidratación.....	136
5.4	Los mutantes más relevantes.....	138
5.4.1	901 ET73	138
5.4.2	4196 ETSP	142
5.4.3	4166 ETSP	144
5.4.4	4025 ETSP	147
6	Conclusiones	151
7	Bibliografía	153

Índice de Figuras

Figura 1.- Mantenimiento de las plantas transgénicas.....	66
Figura 2.- Respuesta de ápices meristemáticos de <i>S. pennellii</i> PE47, que inicialmente no estaban enraizados, al cultivo en medios líquido con diferentes concentraciones de NaCl durante 3 semanas.....	69
Figura 3.- Líneas ETSP con fenotipo silvestre o con diferentes alteraciones tras el cultivo de ápices meristemáticos no enraizados en medio líquido con 100 mM de NaCl durante 3 semanas.....	70
Figura 4.- Plantas PE47 y línea ETSP hipersensible tras el cultivo de ápices meristemáticos no enraizados en medio líquido con 0 mM de NaCl y 100 mM de NaCl.....	71
Figura 5.- Ápices meristemáticos de <i>S. pennellii</i> PE47 enraizados durante 21 días en medio líquido sin NaCl y subcultivados durante 21 días en el mismo medio líquido sin NaCl, con NaCl 100 mM y NaCl 200 mM.....	72
Figura 6.- Réplicas clonales de plantas de cuatro líneas ETSP con diferentes alteraciones tras el cultivo de ápices meristemáticos previamente enraizados en medio líquido con 200 mM de NaCl.....	73
Figura 7.- Crecimiento de ápices meristemáticos de la línea 4165 ETSP cultivados durante tres semanas en medios de enraizamiento sin NaCl y con 100 mM de NaCl.....	75
Figura 8.- Crecimiento de ápices meristemáticos previamente enraizados de la línea 4165 ETSP y cultivados durante tres semanas en diferentes medios.....	75
Figura 9.- Crecimiento de ápices meristemáticos no enraizados previamente de la línea 515 ETSP cultivados durante tres semanas en medios de enraizamiento con 0 mM de NaCl y 100 mM de NaCl.....	76
Figura 10.- Crecimiento de ápices meristemáticos previamente enraizados de la línea 515 ETSP cultivados durante tres semanas en distintos medios.....	77
Figura 11.- Comparación de plantas de <i>S. pennellii</i> PE47 en el sistema de capilaridad tras 14 días a concentraciones de 0, 100, 200, 300 y 400 mM de NaCl.....	80
Figura 12.- Comparación de dos plantas testigo con dos plantas de la línea 4268 ETSP.....	81
Figura 13.- Plantas de la línea 4388 ETSP tras 40 días de cultivo en el sistema hidropónico.....	82
Figura 14.- Comparación de una planta testigo con la línea 5442 ETSP tras 35 días de cultivo en sistema hidropónico con 200 mM de NaCl.....	83
Figura 15.- Plantas de la línea 5509 ETSP cultivadas en el sistema hidropónico.....	84
Figura 16.- Evaluación del desarrollo de plantas procedentes de semilla de dos variedades de tomate en presencia de NaCl.....	86

Figura 17.- Evaluación del desarrollo de las hojas de plantas mutantes de la línea 698 ETMM y plantas hermanas de fenotipo WT tras 4 días en el sistema hidropónico con diferentes concentraciones de NaCl.....	88
Figura 18.- Evaluación del desarrollo de diferentes descendencias de la línea 698 ETMM en presencia de 0, 100 y 200 mM de NaCl en el sistema hidropónico tras 35 días de cultivo.....	88
Figura 19.- Plantas TG2 de la línea 901 ET73 cultivadas en el invernadero.....	90
Figura 20.- Plantas TG2 de la línea 901 ET73 cultivadas en el sistema hidropónico.....	90
Figura 21.-Plantas TG2 de la línea 901 ET73 con fenotipo silvestre y mutante tras 26 días a 0 mM y 200 mM de NaCl en el sistema hidropónico.....	91
Figura 22.-Plantas TG2 de la línea 901 ET73con fenotipo silvestre y mutante tras 42 días de cultivo sin sal en el sistema hidropónico.....	91
Figura 23.- Plantas TG2 de la línea 901 ET73 cultivadas en el invernadero.....	92
Figura 24.- Ausencia de enraizamiento en explantes de ápices meristemáticos reintroducidos al cultivo <i>in vitro</i> a partir de plantas mutantes de la línea 901 ET73.....	93
Figura 25.- Tallos y cortes histológicos de una planta mutante de la línea 901 ET73.....	94
Figura 26.- Ápices y hojas de plantas de fenotipo silvestre y plantas TG1 de la línea 4196 ETSP.....	96
Figura 27.- Planta TG1 de la línea 4196 ETSP cultivada en el invernadero.....	96
Figura 28.-Flores de plantas TG1 de la línea 4196 ETSP y de plantas con fenotipo silvestre.....	97
Figura 29.- Expresión GUS en distintos tejidos de plantas TG1 de la línea 4196 ETSP cultivadas en el invernadero.....	98
Figura 33.- Plantas TG2 de fenotipo silvestre y TG2 mutante de la línea 4166 ETSP cultivadas en el medio de enraizamiento.....	99
Figura 31.- Plantas TG2 de fenotipo silvestre y TG2 mutante de la línea 4166 ETSP cultivadas durante seis meses en invernadero.....	100
Figura 32.-Hibridación Southern Blot con la sonda <i>FA-nptII</i> de las plantas PE47, 4166 ETSP TG1, 4166-4 ETSP TG2 WT, 4166-6 ETSP TG2 M.....	103
Figura 33.- Reacciones de PCR realizadas en cuatro plantas TG2 de la línea 4166 ETSPcon combinaciones de cebadores para amplificar por PCR la totalidad del inserto T-DNA y parte del cuerpo del vector: 6 y 10 (M – KanR), 12 (M – KanS), 19 (WT – KanS), el testigo PE47 y el vector pD991 (C+).....	104
Figura 34.- Plantas TG2 de la línea 4025 ETSP en el invernadero tras 4 meses de cultivo.....	105
Figura 35.- Plantas TG2 de la línea 4025 ETSP en el cultivo <i>in vitro</i>	106

Figura 36.- Desarrollo <i>in vitro</i> de raíces y parte aérea a partir de explantes de ápice meristemático de plantas TG2 de la línea 4025 ETSP silvestres y mutantes en medios con concentraciones crecientes de IAA (0; 0,1; 1 y 10 mg/L).....	107
Figura 37.- Desarrollo <i>in vitro</i> de raíces y parte aérea a partir de explantes de ápice meristemático de plantas TG2 de la línea 4025 ETSP, silvestres y mutantes, en medios con IAA, NAA, IBA, 2,4-D, 2,4,5-T, y 4CPA a dos concentraciones.....	108
Figura 38.- Respuesta morfogénica a partir de explantes de hoja de plantas TG2 de la línea 4025 ETSP, silvestres y mutantes, en los medios IKZ 4.0/4.0/1.0, IK 4.0/4.0 e I4.0.....	109
Figura 39.- Injerto en condiciones axénicas entre plantas silvestres y mutantes de la línea 4025 ETSP.....	110
Figura 40.- Hibridación Southern Blot con la sonda <i>FA-nptII</i> de las plantas PE47 y 4025-13 ETSP TG2mutante.....	111
Figura 41.- Visualización de la expresión del gen <i>uidA</i> mediante el test histoquímico X-gluc en raíces de plantas 4025 ETSP.....	113
Figura 42.-Localización genómica del inserto de T-DNA de la línea 4025 ETSP en el genoma de <i>S. pennelli</i>	113
Figura 43.-Información sobre el gen de <i>Arabidopsis thaliana</i> que presenta mayor homología con Sopen01g041390.....	114

Índice de tablas

Tabla 1. Taxonomía del tomate y especies silvestres relacionados.....	2
Tabla 2.- Genes identificados del modelo ABC en tomate.....	5
Tabla 3.- Medio de germinación MG.....	43
Tabla 4.- Solución mineral MS.....	43
Tabla 5. Medio de enraizamiento I 0.1.....	44
Tabla 6. Medio de inducción de organogénesis IKZ (4.0/4.0/1.0)	46
Tabla 7. Solución vitamínica SH (Shahin, 1985)	47
Tabla 8. Solución nutritiva	49
Tabla 9. Solución X-GLUC	54
Tabla 10. Fijador FAE	55
Tabla 11: Eficacia de las transformaciones realizadas con la trampa de intensificadores en dos accesiones de <i>S. pennellii</i>	66
Tabla 12.-Segregación fenotípica del mutante 4166 ETSP.....	101
Tabla 13.- Segregación fenotípica del mutante 4166 ETSP.....	101
Tabla 14.- Segregación para el carácter resistencia a la kanamicina del mutante 4166 ETSP.....	102
Tabla 15.- Segregación fenotípica del mutante 4025 ETSP.....	110
Tabla 16.- Segregación para el carácter resistencia a la kanamicina del mutante 4025 ETSP.....	111
Tabla 17.- Segregación de la línea 4025 ETSP para el fenotipo y la resistencia a kanamicina.....	112

Resumen

El conocimiento de los genes clave que afectan al desarrollo de las plantas y su tolerancia a estreses abióticos es un aspecto muy importante, tanto desde un punto de vista básico como aplicado. El escrutinio de poblaciones de plantas mutagenizadas permite la identificación de mutantes y, a partir de ellos, conocer los genes responsables de un carácter concreto. Cuando se compara con otras alternativas metodológicas (mutágenos químicos o físicos) la mutagénesis insercional con T-DNA aporta una ventaja adicional, ya que si el gen queda etiquetado por un fragmento de ADN de secuencia conocida su identificación y clonación es más sencilla. Por otro lado, el tomate es una de las especies con mayor importancia económica a nivel mundial que, en los últimos tiempos, se ha considerado también como especie modelo para el estudio de determinados caracteres.

Para lograr la identificación de genes clave en la respuesta de las plantas a los estreses de tipo abiótico y en procesos del desarrollo tanto vegetativo como reproductivo, en nuestro laboratorio se está abordando, en colaboración con los grupos del Dr. Lozano (Universidad de Almería) y de la Dra. Bolarín (CEBAS – Murcia), un proyecto de mutagénesis insercional con tomate y especies silvestres relacionadas, entre ellas *Solanum pennellii*. La tesis doctoral presente se enmarca en este contexto y tiene como objetivos la creación de una colección de plantas transgénicas de *S. pennellii*, el diseño de nuevos métodos aptos para evaluar la tolerancia al estrés salino, la identificación de caracteres relacionados con el estrés hídrico o salino y el escrutinio de algunas líneas de *S. lycopersicum* pre-seleccionadas por mostrar diferentes alteraciones que puedan estar relacionadas con la tolerancia a estreses de tipo abiótico.

Tras abordar estos objetivos se han obtenido los siguientes resultados. Tras obtener más de dos mil líneas transgénicas diploides de *Solanum pennellii* se han evaluado 887 líneas con los diferentes sistemas de identificación de mutantes diseñados. Dos de los métodos de evaluación diseñados se basaron en el cultivo in vitro y uno en un sistema de cultivo in vivo a corto plazo. Además, con esta última metodología se evaluaron 68 líneas de tomate entre las que se identificó un mutante de desarrollo de elevado interés por su relación con la

tolerancia a estreses abióticos. Entre las líneas de *Solanum pennellii* analizadas se han identificado fenotipos con distintas alteraciones. En tres de estas líneas se llevó a cabo una evaluación más avanzada llegando a identificar y clonar el gen afectado en una de ellas. Tanto los mutantes identificados como las metodologías desarrolladas son de gran valor para seguir profundizando en los procesos relacionados con la tolerancia a estreses abióticos en una especie tan importante como el tomate.

Summary

The knowledge of the key genes which crucially affect the development and stress tolerance of plants is a very important task and indispensable for both, the basic and the applied research. The screening of populations of mutagenized plants permits the identification of mutants and, starting with their analysis, the identification of the genes responsible for a certain trait. Compared to alternative methods (e.g. chemical or physical mutagens) the insertional mutagenesis using T-DNA offers the additional advantage of labeling the altered gene with a piece of known sequence that will facilitate its identification and cloning. On the other hand, the tomato is one of the world's economically most important vegetables which over the last few years also gained the status of a model organism for certain traits.

In order to identify the relevant genes involved in the response of plants to abiotic stresses and processes related to the vegetative and reproductive development, our laboratory performs in collaboration with Dr. Lozano's (University of Almería) and Dr. Bolarín's (CEBAS-Murcia) groups a project of insertional mutagenesis in tomato and related wild species, among them *Solanum pennellii*. The present PhD-thesis is embedded in this context and aims to create a collection of transgenic plants of *S. pennellii*, design new methods helpful for evaluating the tolerance to salt stress, the identification of traits related to water or salt stress and screen several lines of *S. lycopersicum* which were pre-selected for showing different aberrations that could be related to the tolerance to abiotic stresses.

By tackling these tasks it was possible to obtain the following results. After obtaining more than two thousand diploid transgenic lines of *S. pennellii*, 887 of them were screened with the different systems developed for detecting mutant plants. Two of the methods designed were based on *in vitro* culture and one for the short-term evaluation *in vivo*. With the latter one a total of 68 tomato lines were screened and among them a mutant with alterations in its development which could be interesting for its relation to abiotic stress tolerance identified. In the collection of *S. pennellii* several plants showing phenotypes with different alterations were detected. Three of them received an advanced examination and it was possible to identify and clone the affected gene in one case. The detected mutants as much as the developed technologies are of great value for deepening the understanding of the

processes related to abiotic stress tolerance in a crop with the outstanding importance of the tomato.

Resum

El coneixement dels gens clau que afecten al desenvolupament de les plantes i la seua tolerància a estressos abiòtics és un aspecte molt important, des d'un punt de vista bàsic com a aplicat. L'escrutini de poblacions mutagenitzades de plantes permet la identificació de mutants i a partir d'ells conèixer els gens d'un caràcter concret. Quan es compara amb altres alternatives metodològiques (mutàgens físics o químics) la mutagènesi amb T-DNA aporta un avantatge addicional, ja que al tindre el gen un fragment etiquetat pel T-DNA de seqüència coneguda la seua identificació i clonació és més senzilla. D'altra banda, la tomaca és una de las espècies de major importància econòmica a nivell mundial que, en els últims temps, s'ha considerat també una espècie model per a l'estudi de determinats caràcters. Per a aconseguir la identificació de gens clau en la resposta de les plantes a estressos abiòtics i processos de desenvolupament tant vegetatiu com reproductiu, en el nostre laboratori s'està abordant amb col·laboració amb els grups del Dr. Lozano (Universitat d'Almeria) i la Dra. Bolarín (CEBAS-Murcia), un projecte de mutagènesi insercional amb tomaca i espècies silvestres relacionades, entre elles *Solanum pennellii*. La tesi doctoral s'emmarca en aquest context i té com a objectius la creació d'una col·lecció de plantes transgèniques de *Solanum pennellii*, el disseny de nous mètodes aptes per a avaluar la tolerància a l'estrès salí, la identificació de caràcters relacionats amb l'estrès hídric i salí, l'escrutini d'algunes línies de *S. lycopersicum* pre-seleccionades per mostrar diferents alteracions que puguen estar relacionades amb la tolerància a estressos de tipus abiòtic. En abordar estos objectius s'han obtingut els següents resultats. Després d'obtindre més de dos mil línies transgèniques diploides de *Solanum pennellii* s'han avaluat 821 línies amb els diferents sistemes d'identificació de mutants dissenyats. Dos dels mètodes d'avaluació dissenyats es basaren en el cultiu *in vitro* i un en un sistema de cultiu *in vivo* a curt termini. A més, amb aquesta última metodologia s'avaluaren 68 línies de tomaca entre les quals s'identificà un mutant de desenvolupament d'elevat interès per la seua relació amb la tolerància a estressos abiòtics. Entre les línies de *Solanum pennellii* analitzades s'han identificat fenotipus amb diferents alteracions. En tres d'estes línies es va dur a terme una avaluació més avançada arribant a identificar el gen afectat en una de les línies. Tant els mutants identificats com les metodologies desenvolupades són de gran valor per a seguir aprofundint en els processos

relacionats amb la tolerància a estressos abiòtics en una espècie tan important como la tomaca.

1 Introducción

1.1 Origen y taxonomía del tomate

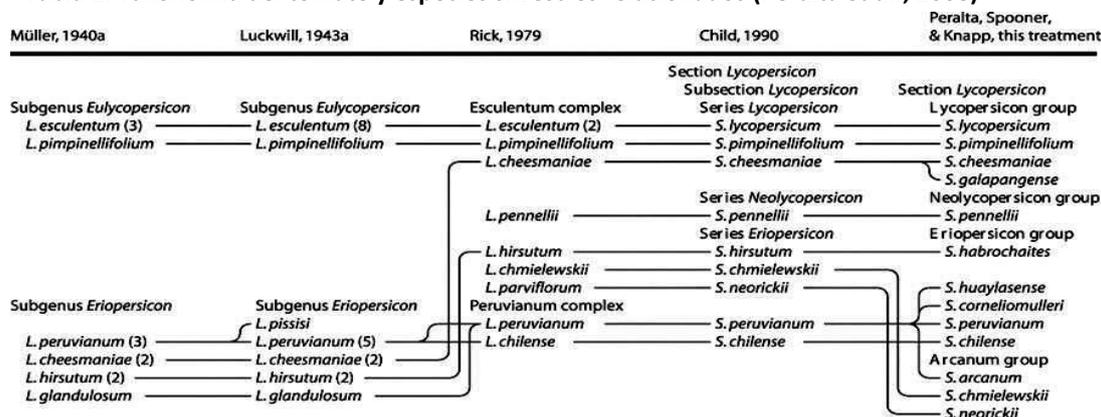
Con la intención de descubrir una nueva ruta hacia las Indias, en 1492 Cristóbal Colón llegó primero al Caribe y, durante su cuarto viaje, al continente de las Américas. Aunque no descubrió un trayecto a India, China y Japón, con sus riquezas esperadas, abrió el camino para nuevos descubrimientos del mismo valor, entre ellos el tomate. En este momento el tomate ya estaba domesticado, un proceso sobre el cual durante mucho tiempo existieron dos hipótesis diferentes que proponían tanto a Perú como a México como posibles centros de domesticación (Peralta y Spooner, 2006). McMeekin (1992) interpretó el dibujo de una herramienta para hilar de Colombia de la época entre 500 y 1000 d.C. como una flor de tomate y, por lo tanto, como el primer indicio de la incorporación de este fruto al consumo humano, pero conviene tomar este análisis con cautela. Aparte de esta ilustración no existen objetos de la época pre-colombina que puedan servir como prueba para identificar el sitio exacto de la domesticación de tomate (Rick y Holle, 1990), aunque algunos autores han propuesto que México fue el lugar más probable (Robertson y Labate, 2006).

Recientemente, el análisis molecular de las relaciones entre *Solanum pimpinellifolium*, *Solanum lycopersicum* var. *cerasiforme* y tomate ha dado lugar a una explicación sobre cómo ocurrió la domesticación de esta especie. Según los resultados de estos trabajos, en los que se ha llevado a cabo el análisis comparativo de genes relacionados con dos de las características más relevantes para el consumo humano - el tamaño y la forma del fruto -, el proceso de domesticación ocurrió en dos fases. El primer paso se realizó en la región Andina de América Latina y convirtió individuos de *S. pimpinellifolium* en los primeros representantes de *S. lycopersicum* var. *cerasiforme*. Estos cultivos primitivos fueron introducidos en Mesoamérica, donde se llevó a cabo un segundo proceso de selección que dio lugar a los precursores de *S. lycopersicum* var. *lycopersicum* que son los que encontraron los conquistadores españoles en el momento de su llegada (Blanca *et al.*, 2012; Lin *et al.*, 2014; Blanca *et al.*, 2015).

Las primeras pruebas de su introducción en Europa se encuentran en Italia, donde Matthiolus describió una planta parecida a la mandrágora con frutos amarillos en 1544 (McCue, 1952). En la década posterior apareció el primer grabado en madera realizado por Dodoens en 1554 y el primer dibujo coloreado de una planta de tomate con frutos amarillos y rojos en un libro del alemán Georg Oelinger (1553), un farmacéutico y coleccionista de plantas. Aunque en la primera mención del tomate se describió que podía ser utilizado como comida, su aceptación general como alimento tardó más de 100 años debido a su pertenencia a la familia de las Solanáceas que comprende varias especies tóxicas como la mandrágora (*Mandragora officinarum*) y la belladona (*Atropa belladonna*). Desde el siglo XVIII Europa se convirtió en centro de distribución de esta especie al resto del mundo (McCue, 1952).

Con su llegada a Europa empezó también su clasificación botánica y desde el comienzo su posición taxonómica fue objeto de controversias que han durado hasta la actualidad. Debido a su similitud a plantas conocidas en el siglo XVI, que pertenecían al género *Solanum*, el tomate se nombró inicialmente *Solanum pomiferum*. En 1561 Anguillara asignó el nombre *Lycopersicon* haciendo referencia a un fruto que fue descrito por el griego Galen en la antigüedad y que tenía la fama de convertir hombres en lobos (*lycos*=lobo y *persicon*=melocotón) (Peralta *et al.*, 2008). Con la introducción de la nomenclatura binominal por Linneo en 1753 el tomate recibió el nombre *Solanum lycopersicum*, a lo que se opuso Miller en 1754 nombrándolo *Lycopersicon esculentum*. Tras alguna modificación posterior en su denominación, así como en la de otras especies relacionadas, actualmente se ha establecido que *Solanum lycopersicum* es la denominación correcta, por lo que será la que emplearemos en esta Tesis (Tabla 1).

Tabla 1. Taxonomía del tomate y especies silvestres relacionados (Peralta *et al.*, 2008)



1.2 Características de una planta de tomate y algunos genes que las controlan

Como todos los organismos multicelulares, en una planta de tomate se desarrollan diferentes tipos celulares, tejidos y órganos que pueden variar a lo largo de su ciclo vital. Toda la información necesaria para organizar y coordinar las múltiples funciones vitales y asegurar el cumplimiento de este ciclo, desde la germinación hasta la maduración de las semillas, está recogida en el genoma completo de la planta. Los mutantes, con sus variaciones genéticas y sus fenotipos alterados, facilitan el estudio de estos mecanismos biológicos. Gracias a ellos disponemos de un material con el que comparar frente al fenotipo silvestre por lo que se convierten en una herramienta de gran utilidad para deducir la función de un gen si podemos identificar la secuencia alterada en dicho mutante. Teniendo en cuenta esta relación entre las características de una planta y los genes que las controlan, en esta descripción morfológica se incluyen algunos de los genes con una influencia relevante sobre el desarrollo del tomate.

La planta de tomate permanece herbácea durante su ciclo de vida y solamente en la base del tallo y la parte superior de la raíz ocurre cierto crecimiento secundario con lignificación. Aunque el crecimiento de las especies silvestres y de muchas variedades comerciales es indeterminado, se han obtenido variedades de tomate con desarrollo determinado. Este cambio se ha producido gracias a la mutación del gen *SELF PRUNING (SP)* (Pnueli *et al.*, 1998). Las variedades de crecimiento indeterminado suelen necesitar entutorado, mientras que las de crecimiento determinado tienen un porte ligeramente rastrero.

Las hojas adultas son complejas, pinnadas y los folíolos pueden variar entre estrechamente elípticos, ovalados u orbiculares y su base entre truncada, redonda y cordada.

El inicio de la floración en la sección *Lycopersicon* está controlado por varios factores. El estado de desarrollo de la planta es el que tiene mayor importancia (Dielen *et al.*, 2004; Samach y Lotan, 2007). En función de la especie y/o el cultivar se termina la fase juvenil con la primera inflorescencia que se forma después de la 6ª a 12ª hoja (Sawhney y Greyson, 1972). Para ello, el meristemo apical se convierte en un meristemo de inflorescencia, con lo cual el crecimiento del segmento inicial de la planta finaliza y se activa el meristemo lateral más cercano al ápice para formar la primera unidad simpodial. Una función esencial en este

cambio inicial a la fase reproductiva reside en los genes *FALSIFLORA (FA)* y *SINGLE FLOWER TRUSS (SFT)* (Molinero-Rosales *et al.*, 1999, 2004; Lifschitz y Eshed, 2006). En la mayoría de las especies estas unidades simpodiales tienen tres fitómeros y una nueva inflorescencia. La excepción a esta norma es *Solanum pennellii*, en la que se forman solamente dos fitómeros entre inflorescencias consecutivas (Lifschitz y Eshed, 2006). Por último, la inducción de la floración es relativamente independiente de la longitud del día y depende más de la integral de la luz del día, parámetro que combina la duración con la intensidad de la luz (Kinet, 1977; Atherton y Harris, 1986; Kinet y Peet, 1997).

La inflorescencia de tomate presenta una arquitectura muy variable entre cultivares. Aunque la formación de los órganos reproductivos está bien estudiada y existen colecciones considerables de mutantes afectados en los distintos procesos, desde el cambio de un meristemo vegetativo a uno de inflorescencia y finalmente de flor, no existe consenso sobre si la inflorescencia es de tipo racimoso o cimoso (Lippmann *et al.*, 2008; Lozano *et al.*, 2009; Périlleux *et al.*, 2014), aunque el crecimiento simpodial de la planta entera favorece la clasificación como cimoso. El número de flores a lo largo del pedúnculo es muy variable. Esto se puede comprobar al comparar entre especies silvestres y cultivares de tomate. Además, en la actualidad se disponen de varios mutantes que varían en este carácter, como *anantha (an)* o *compound inflorescence(s)*, con una multitud de flores, y *uniflora (uf)* con una única flor por inflorescencia (Allen y Sussex, 1996; Dielen *et al.*, 1998; Quinet *et al.*, 2006; Lippman *et al.*, 2008).

La conexión entre el fruto y la inflorescencia es el pedicelo, que también es el punto de abscisión en el caso de ausencia de polinización de la flor o en el momento de la madurez del fruto. Si la polinización es exitosa, el pedicelo continúa su crecimiento y puede mostrar diferentes formas con respecto a longitud, grosor y curvatura. En la mayoría de las especies la zona de abscisión se encuentra en la primera mitad del pedicelo; la excepción es, de nuevo, *S. pennellii* que la tiene localizada en la base de la flor (Peralta *et al.*, 2008; Caicedo y Peralta, 2013). El proceso de abscisión se divide en diferentes etapas. En la primera se observa la diferenciación de algunas células y la aparición de una susceptibilidad para señales de abscisión en esta zona. A continuación surge un proceso de degradación de las células en la zona de abscisión que está principalmente controlado por etileno y donde participan, entre otras, las enzimas hidrolíticas que disuelven las paredes celulares. Durante esta fase de separación se empieza a formar una capa protectora y con su terminación

finaliza el proceso (Bar-Dror *et al.*, 2011). Además de otros efectos pleiotrópicos, una mutación en el gen *JOINTLESS (J)* da como consecuencia la ausencia de esta zona de abscisión, una alteración relevante para poder realizar la cosecha mecanizada en cultivares destinados al procesamiento industrial (Rick y Sawant, 1955; Mao *et al.*, 2000).

Las flores de los miembros de la sección *Lycopersicon* son simétricas y se disponen en cuatro verticilos: sépalos, pétalos, estambres y pistilo. Como en otras angiospermas, la organización de estos órganos está controlada por diversos genes cuya interacción describe el modelo ABC (Tabla 2).

Tabla 2.- Genes identificados del modelo ABC en tomate. Fuente: Lozano *et al.*, 2009

Mutant or gene	Phenotype	Gene
A-class <i>macrocalyx (mc)</i>	Large sepals, indeterminate inflorescence	<i>LeMADS-MC (MC in text)</i>
B-class <i>stamenless (sl)</i>	Homeotic conversion of petals and stamens into sepals and carpels, respectively	<i>SL</i>
<i>TM6</i>	Silencing of <i>TM6</i> alters stamen development	<i>TM6</i>
C-class <i>TAG1</i>	Down-regulation of <i>TAG1</i> causes homeotic transformations of stamens and carpels	<i>TAG1</i>
E-class <i>TM5</i>	Down-regulation alters organ differentiation in the inner three floral whorls	<i>TM5</i>
<i>TM29</i>	Down-regulation of <i>TM29</i> affects the maintenance of floral meristem identity (flowers altered in the inner three whorls)	<i>TM29</i>

En la mayoría de los casos, el cáliz, como verticilo más exterior de los órganos florales, consiste en cinco a ocho sépalos verdes. Éstos pueden variar su morfología entre lineal y espatulada, con una punta redonda en el caso de *S. pennellii*, y están unidos en su base. Su crecimiento continúa durante la maduración del fruto y durante su desarrollo se pueden torcer hacia el fruto o apartarse del mismo. El color de los pétalos es amarillo y la corola que forman tiene un tamaño que oscila entre 1 y 5 cm. Menos en el caso de *S. pennellii* que muestra una simetría bilateral, las flores de los miembros de la sección son completamente simétricas (Peralta *et al.*, 2008). El androceo está formado por estambres con un filamento corto como soporte y las anteras amarillas que contienen el polen en sus sacos polínicos. El entrecruzamiento de pelos que crecen en los laterales de las anteras hace que los estambres se unan y formen un cono simétrico en la mayoría de las especies (Sekhar y Sawhney, 1984). En *S. pennellii*, la relativamente gran longitud de los estambres superiores causa una curvatura hacia debajo del tubo. En el momento de la maduración del polen, los sacos polínicos están perforados por poros que dan lugar a la dehiscencia longitudinal por el lado interior de la antera (Peralta *et al.*, 2008). En todas las especies los carpelos están fusionados y forman un ovario redondo o elíptico donde se encuentra la cavidad seminal con los óvulos

(Peralta *et al.*, 2008). En la mayoría de las especies silvestres las flores tienen una estructura bi-carpelar, mientras que en los cultivares comerciales de tomate se observa una gran variación, lo que permite encontrar genotipos con gineceos multi-carpelares. Tras la fecundación, los carpelos se convierten en los lóculos del fruto. En la actualidad se conocen dos de los genes principales que controlan este carácter, *LOCULE NUMBER (LC)*, identificado por Muños y colaboradores (2011), y *FASCIATED (FAS)*, clonado por Cong y colaboradores (2008).

El estigma se encuentra dentro del cono de las anteras, lo cual favorece su auto-polinización, o fuera del mismo, lo cual facilita la recepción de polen de otros individuos. Tras la fertilización comienza la formación del fruto de tipo baya carnosa con una maduración climatérica. En este proceso los tejidos del gineceo sufren varias modificaciones. La pared del ovario se convierte en el pericarpio que, a su vez, consta de epicarpio, mesocarpio y endocarpio. El epicarpio está formado por la cutícula y la epidermis que protegen el fruto contra la transpiración y pérdida de agua. En el mesocarpio se encuentran tejidos parenquimatosos con células grandes y vacuolas expandidas que también contienen cloroplastos con función fotosintética. El endocarpio consiste de una sola capa de células y separa el pericarpio de los lóculos. Estos lóculos están separados entre ellos por el septo que tiene su origen en los bordes de los carpelos y que se une en la columela, el tejido central del fruto. Junto a la columela se encuentra la placenta, que, mediante los funículos, administra los nutrientes a las semillas. Las semillas en las cavidades locales están rodeadas por un tejido gelatinoso, el mucílago (Pesaresi *et al.*, 2014).

Según Gillaspay y colaboradores (1993) se pueden diferenciar tres fases en el proceso de la formación del fruto. La primera comienza en el estadio de antesis y está relacionada con el desarrollo del ovario y la decisión de abortar o continuar con la formación del fruto. En la segunda fase, el crecimiento del fruto ocurre principalmente como consecuencia de divisiones celulares, siendo el momento donde comienzan también a desarrollarse los embriones de las semillas. Finalmente, en la tercera fase cesa la división celular y el fruto continúa creciendo a través de la expansión celular hasta que alcanza el tamaño final, termina el desarrollo del ovario y maduran las semillas. En las variedades de tomate las tres características del fruto que van a definir su clasificación son el tamaño, la forma y el color.

En las especies silvestres el tamaño del fruto es de 1 a 2 centímetros de diámetro. Con respecto al peso, la variabilidad del tomate cultivado abarca frutos desde los 20 g (tipo cherry) hasta los 500 g (tipo beef). Los genes *LC* y *FAS* que influyen en el número de lóculos también afectan al tamaño del fruto (Cong *et al.*, 2008; Muños *et al.*, 2011). A partir del estudio de líneas de introgresión entre tomate y *S. pimpinellifolium*, se identificaron dos genes adicionales *FRUIT WEIGHT 2.2* y *3.2* que tienen gran influencia sobre las dimensiones del fruto (Frary *et al.*, 2000; Chakrabarti *et al.*, 2013). Más recientemente, los trabajos que llevamos a cabo en colaboración con el Dr. Lozano han revelado que el gen *ENO* (*EXCESSIVE NUMBER OF FLORAL ORGANS*) afecta el tamaño del meristemo floral y, como consecuencia, el número de órganos florales y el tamaño del fruto (Fernández-Lozano *et al.*, 2015).

En las especies silvestres la forma del fruto varía entre globoso, elíptico y ligeramente piriforme. En las variedades de tomate se pueden encontrar formas redondas, piriformes, aplastadas, cordiformes, campanuladas y alargadas (Bergougnoux, 2014). Se han identificado dos genes que regulan la forma del fruto, *SUN* y *OVATE*. *SUN* codifica una proteína que actúa como un regulador positivo de la elongación y se supone que altera el nivel de hormonas o metabolitos secundarios (Xiao *et al.*, 2008). El producto del gen *OVATE* es un regulador negativo que presumiblemente reprime la transcripción y origina frutos con forma de pera (Liu *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2007).

En las especies silvestres se obtienen frutos con un color entre verde, amarillo, naranja y rojo. Las variedades del tomate cultivado añaden a los colores ya existentes en las especies silvestres pigmentación blanca, rosa, morada y variedades dicromáticas. Los carotenoides, y dentro de ellos especialmente el licopeno, son los pigmentos principales que causan el color rojo característico de la mayoría de las variedades cultivadas. Según Labate y colaboradores (2007) se han identificado más de veinte genes que participan en la síntesis de estos compuestos o que determinan el tipo, contenido y distribución de estas sustancias en el fruto del tomate. Por ejemplo, a partir del mutante “*yellow flesh*” se identificó el gen *PSY-1* que participa en la síntesis de carotenoides y cuya pérdida de función inhibe la metabolización de licopeno, dando como resultado frutos de color amarillo (Fray y Grierson, 1993). Adicionalmente, mutantes como *ripening inhibitor (rin)*, *nonripening (nor)*, *never-ripe (nr)*, *colorless nonripening (Cnr)*, *green-ripe (Gr)*, *green flesh (gf)*, *high pigment 1 (hp1)* y *high pigment 2 (hp2)* han permitido la identificación de otros genes clave en la determinación del color del fruto en tomate (Osorio *et al.*, 2011).

Una de las consecuencias de la selección humana a lo largo de la domesticación es el aumento del tamaño de las semillas en los cultivares de tomate; por ejemplo, mientras que una semilla madura de *S. pennellii* pesa aproximadamente 0.26 mg la de tomate supera los 3 mg (Luckwill, 1943; Berry y Bewley, 1992; Doganlar *et al.*, 2000; Orsi y Tanksley, 2009). El color de las semillas de las especies de la sección *Lycopersicon* varía entre amarillo y marrón oscuro. Tienen una forma oval aplanada y un tamaño entre 1,5 mm y 5 mm según la variedad. Tanto tomate como *S. pennellii* presentan excrecencias parecidas a pelos en la superficie de las semillas que son típicas del grupo de los *Lycopersoides* (Peralta *et al.*, 2008). El proceso de germinación comienza con la debilitación del endospermo y termina con la ruptura de la testa por la radícula.

La radícula del embrión o raíz primaria se forma durante las primeras divisiones celulares en el proceso embriogénico. Las raíces laterales o secundarias son las que surgen a partir de la raíz embrionaria. Por otra parte, también se pueden producir raíces adventicias a partir de tejidos diferentes. Aunque el origen de todas estas raíces es diferente, su esquema arquitectónico se repite (Scheres *et al.*, 1996). El ápice de la raíz contiene el meristemo radical, una población de células madre que consiste en el centro quiescente con una división celular lenta y dos capas de células madre adyacentes con una multiplicación más rápida que dan lugar a los diferentes tejidos (Jiang y Feldmann, 2005). Al contrario de lo que ocurre con el meristemo apical del tallo, el meristemo radicular puede producir células en los dos sentidos. En dirección distal se forma la caliptra, que provee de protección mecánica al meristemo, mientras que en sentido contrario, las células generadas contribuyen al crecimiento de la raíz. Los tejidos de la raíz se forman ontogénicamente a partir de cuatro tipos de células iniciales. El primero da lugar a la parte central de la caliptra, la columela. A partir del segundo se desarrollan las células de la parte lateral de la caliptra y la epidermis de la raíz. El córtex y la endodermis provienen del tercer tipo y el último da como resultado el periciclo y los haces vasculares que forman la estela central (Dolan *et al.*, 1993).

Las raíces laterales se desarrollan a partir del periciclo (Steeves y Sussex, 1989). Este proceso se puede dividir en las siguientes etapas: estimulación y dediferenciación del periciclo, división y diferenciación celular que resulta en el desarrollo de un primordio, emergencia de la raíz lateral debido a la expansión celular y, finalmente, la activación del meristemo de la raíz lateral (Malamy y Benfey, 1997).

Las raíces adventicias son raíces post-embrionales que no proceden del periciclo radicular y pueden desarrollarse como consecuencia de condiciones desfavorables o daños mecánicos a partir de diferentes tejidos como hojas, tallos o tejidos de la raíz (Li *et al.*, 2009). Estas raíces adventicias se desarrollan mayoritariamente a partir del cámbium o los haces vasculares y existen dos posibilidades para su formación. En la ruta directa, una división mitótica de las células en cuestión resulta directamente en primordios radiculares. En la rizogénesis indirecta interviene la formación de un callo como paso intermedio (da Costa *et al.*, 2013). Se han encontrado diferentes variaciones alélicas de genes relacionados con la capacidad de formar raíces adventicias en las especies silvestres *S. peruvianum* y *S. pennellii*. Estos alelos pueden ser una buena fuente de variación para mejorar este carácter de elevado interés biotecnológico y agronómico (Lombardi-Crestana *et al.*, 2012; Arikita *et al.*, 2013).

La raíz cumple varias funciones esenciales que, especialmente en condiciones adversas como el estrés hídrico o salino, pueden ser de gran importancia. Sin embargo, los conocimientos sobre los genes que determinan su crecimiento son más reducidos en comparación con lo que se sabe sobre el desarrollo de la parte aérea de las plantas (Jung y McCouch, 2013). Aún así, se han identificado algunos genes, como *SCARECROW (SCR)* y *SHORT-ROOT (SHR)*, que regulan la renovación de células madres y su distribución en las raíces (Di Laurenzio *et al.*, 1996; Hellariutta *et al.*, 2000). Por otra parte, *BREVIS RADIX (BRX)* está involucrado en la proliferación y extensión de las células en la zona del crecimiento del ápice radicular (Mouchel *et al.*, 2004).

1.3 Importancia económica y científica del tomate

Su buena adaptación a diferentes áreas de cultivo, que se extiende desde regiones con un clima sub-ártico hasta países tropicales, y las posibilidades múltiples para su uso, tanto para el consumo en fresco como producto procesado, convierten al tomate en la hortaliza más importante a nivel mundial después de la patata, según datos de la FAO. Esta relevancia se refleja también en su posicionamiento en el listado de las especies vegetales con mayor importancia económica a nivel mundial, incluyendo cereales y otros frutos del campo, donde ocupa la novena posición con respecto a cantidad producida y la cuarta con respecto al valor generado (59.103 millones de dólares).

En los últimos 30 años la superficie para el cultivo de tomate casi se ha duplicado. Mientras que en 1982 se cultivaban 2,5 millones de hectáreas, en 2012 se alcanzaron los 4,8 millones de hectáreas. En el mismo periodo la productividad por hectárea ha subido cerca del 50%, pasando de 22,9 t/ha a 33,7 t/ha, un valor que se ha estabilizado desde 2009. Estos parámetros hacen que en 30 años hayamos triplicado la producción mundial pasando de 58 millones de toneladas a 162 millones de toneladas en 2012.

Casi un tercio de la cosecha mundial (50,1 millones de toneladas) está ubicada en China. Le siguen India, con 17,5 millones de toneladas, y EEUU, con 13,2 millones de toneladas, que ocupan la segunda y tercera posición, respectivamente. En Europa, Italia y España son los productores más importantes con una cosecha de 5,1 y 4,0 millones de toneladas, ocupando las posiciones 7ª y 8ª en el ranking mundial. Sin embargo, en cuanto a productividad, los países europeos son quienes encabezan la clasificación, destacando Países Bajos (47,6 t/ha), Bélgica (46,3 t/ha) e Islandia (43 t/ha). Esto se consigue gracias al alto grado de tecnificación que tiene el cultivo de tomate en estos países, incluyendo calefacción, iluminación y gasificación artificial.

En cuanto a las variedades que se cultivan, existe una gran variabilidad con respecto a color, tamaño y forma de sus frutos. Las variedades locales se siguen cultivando, aunque la mayor parte de la superficie cultivada está ocupada hoy en día con variedades híbridas comercializadas por las casas de semillas. Se estima que el mercado de las semillas de estas variedades híbridas genera un valor comercial cercano a los 500 millones de euros anuales (Bai y Lindhout, 2007).

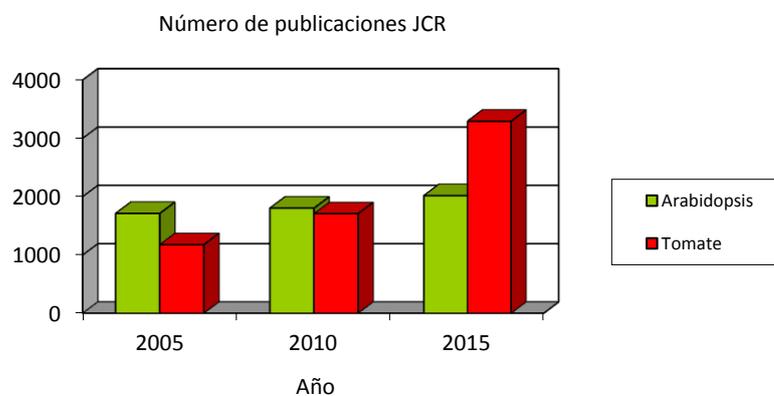
Pese a la gran variabilidad a nivel fenotípico (especialmente, tamaño, forma y color del fruto), la diversidad genotípica de las variedades cultivadas del tomate es muy limitada para otros caracteres. Esta limitación se puede explicar, entre otros motivos, por el efecto fundador al inicio del proceso de domesticación del tomate. Este término describe las consecuencias que genera la selección de unos pocos individuos para obtener las poblaciones siguientes (Zamir, 2001). Además, su cultivo en México en tiempos pre-colombinos, se realizó lejos de su origen y centro de diversidad en los Andes, lo cual imposibilitó una hibridación espontánea con otras especies silvestres relacionadas. Su distribución a nivel global, a partir de unas pocas plantas que se llevaron desde América a Europa, y de ahí al resto del mundo, produjo probablemente un nuevo estrechamiento en la variabilidad genética de la especie (Rick, 1976; Nesbitt y Tanksley 2002). Como resultado, los

cultivares disponibles actualmente representan aproximadamente el 5% de la variabilidad genética disponible en *Lycopersicon* (Miller y Tanksley, 1990). Esta separación entre el tomate cultivado y sus ancestros perduró hasta principios del siglo XX. En ese momento se empezó a reconocer el valor de estas especies como fuentes de variación genética en caracteres relevantes que se perdieron durante el proceso de domesticación. Uno de los primeros éxitos de los cruzamientos entre especies silvestres y cultivares de tomate fue la introducción de una resistencia a *Cladosporium fulvum* proveniente de *S. pimpinellifolium* en 1934 (Walter, 1967). Se estima que desde entonces se han transferido más de 50 caracteres de diferentes especies silvestres al tomate, fundamentalmente resistencias a patógenos (Pan *et al.*, 2000; Hajjar y Hodgkin, 2007).

Aunque toda esta labor de mejora ha sido realizada por gran cantidad de investigadores, destaca el esfuerzo realizado por Charles M. Rick que dedicó su vida a ampliar el conocimiento que se tiene del género *Solanum*. Como ejemplos de sus aportaciones, cabe destacar el desarrollo del primer marcador molecular, un alelo de un iso-enzima asociado a una resistencia a nemátodos, la transferencia del gen *jointless-2* desde *S. cheesmaniae* a los cultivares modernos de tomate, la construcción del primer mapa de ligamiento genético y la generación de líneas de introgresión de especies silvestres en un cultivar de *S. esculentum* (Tanksley y Kush, 2003). Por otro lado, sus aportaciones en la recolección de germoplasma en los centros de origen de la sección *Lycopersicon*, su clasificación y experimentos de mutagénesis fueron la base para la creación del banco de germoplasma ("Tomato Genetics Stock Center") en la Universidad de Davis que fundó y que fue nombrado en su honor en 1990 como "Charles M. Rick Tomato Genetics Resource Center". Esta institución administra y mantiene las semillas de más de 1.500 accesiones de la sección (Robertson y Labate, 2006) y representa la herencia de este investigador. Este esfuerzo, en combinación con otras colecciones importantes, han convertido al tomate y a sus especies silvestres en la hortaliza mejor conservada (Bauchet y Causse, 2012). De hecho, la FAO en 2010 ya contaba con casi 84.000 accesiones de la sección *Lycopersicon* en los bancos de germoplasma de todo el mundo. Las colecciones más grandes se encuentran en el AVDRC en Taiwán (más de 7.500 accesiones) y en el USDA en los EEUU (más de 6.200 accesiones).

El tomate es una especie con una característica que le diferencia de otros organismos modelo en investigación de plantas como *Arabidopsis* o arroz: tiene un fruto carnoso que es capaz de madurar y acumular metabolitos (Bauchet y Causse, 2012). Además, es una especie

cuyo cultivo es sencillo, tiene un ciclo de vida relativamente corto, es insensible al fotoperiodo, se puede autofecundar o cruzar con otros genotipos fácilmente y se puede propagar asexualmente. Por otra parte, existen numerosos mapas genéticos y marcadores asociados a caracteres de interés y su genoma, de tamaño pequeño (950 Mb), ha sido secuenciado (Tomato Genome Consortium, 2012). Estos esfuerzos han convertido al tomate en un organismo modelo en muchos aspectos de la investigación con plantas. De hecho, si se compara la evolución del número de publicaciones JCR en cuyo título aparece tomate respecto de las que tiene como especie de estudio *Arabidopsis*, se puede ver el incremento significativo que ha tenido la investigación en tomate en la última década.



Por último, como se ha comentado en un apartado anterior, la disponibilidad de mutantes afectados en caracteres del desarrollo ha permitido profundizar en el conocimiento de los mecanismos que regulan estos caracteres y conocer alguno de los genes clave en estos procesos.

Los mutantes se pueden clasificar en función de la cantidad de información genética que se ha visto afectada en mutaciones génicas (modificación de uno o unos pocos nucleótidos de un gen), mutaciones estructurales (alteración de la arquitectura de los cromosomas) o mutaciones genómicas (cambio en el número de cromosomas de un organismo). Otra forma de clasificar a los mutantes es mediante el origen de dicha mutación: espontánea o inducida. Aunque las mutaciones espontáneas ocurren con una frecuencia muy baja, son de gran relevancia para la evolución de las especies y para su utilización para el beneficio del ser humano. Un ejemplo de esto serían las mutaciones espontáneas que ocurrieron en teosinte y que fueron claves en el origen del maíz cultivado (Buckler *et al.*, 2001; Vollbrecht y Sigmon, 2005). Entre estas mutaciones cabe destacar *teosinte branched1 (tb1)* (Doebley *et al.*, 1995),

barren stalk1 (ba1) (Gallavotti et al., 2004) y *teosinte glume architecture 1 (tga1)* (Dorweiler et al., 1993), entre otras.

Debido a que las mutaciones espontáneas surgen con baja frecuencia, su valor para el análisis funcional de los genes afectados es limitado y conlleva ciertas complicaciones como la necesidad de estudiar grandes poblaciones. Aun así, sus efectos se examinaron al principio del siglo XX, donde los trabajos de Hugo de Vries, que también definió el término mutación, están valorados como los primeros que lo estudian de forma científica (van Harten, 1998). De Vries también propuso el uso de fuentes de radiación como los rayos X para aumentar la tasa de mutación, algo que Muller llevó a la práctica con *Drosophila* en 1927 y que inició la era de las mutaciones inducidas. Los primeros experimentos con plantas se realizaron simultáneamente y fueron publicados de forma independiente por Stadler y Stubbe en 1928 (Acquaah, 2007; Shu, 2012). Aparte de los rayos X que se utilizaron en estos primeros estudios se descubrieron otros tipos de radiación y partículas subatómicas que pueden causar mutaciones y que están incluidos en el grupo de los agentes mutágenos físicos.

El efecto de los mutágenos químicos se demostró por primera vez en *D. melanogaster* (Auerbach y Robson, 1946). En el ámbito de la mutagénesis de plantas, el metanosulfonato de etilo (EMS) sigue teniendo relevancia, especialmente desde el desarrollo de una técnica llamada TILLING, que combina la generación de mutaciones mediante agentes químicos con métodos de genética molecular para localizar las mutaciones puntuales. Sin embargo, existe un inconveniente muy importante para llegar a identificar el gen mutado a partir de mutantes espontáneos o inducidos por agentes físicos o químicos. Estos mutantes no tienen etiquetado el gen alterado, por lo que se precisan años de trabajo y esfuerzo para llegar a identificar y clonar el gen responsable de los fenotipos mutantes. Una alternativa para acortar estos plazos y llegar de forma más rápida al gen responsable de la mutación observada es la utilización de la mutagénesis insercional.

1.4 La mutagénesis insercional

Gracias al desarrollo de la tecnología del ADN recombinante y a los métodos de transformación genética basados en técnicas de cultivo *in vitro* se han podido obtener plantas transgénicas e iniciar programas de mutagénesis insercional. En 1902 G. Haberlandt

postuló una de las premisas clave para el cultivo *in vitro*: teóricamente las células de una planta poseen todos los requisitos y la capacidad para vivir, crecer y formar una nueva planta. Esta capacidad se denomina totipotencia. Sin embargo, se necesitaron más de 60 años para conseguir la comprobación experimental de este principio partiendo de células diferenciadas. Vasil y Hildebrandt en 1965 consiguieron regenerar una planta entera a partir de células individuales y diferenciadas. La formulación de un medio nutritivo adecuado para el cultivo *in vitro* de un gran número de especies (Murashige y Skoog, 1962) y la identificación de las auxinas y citoquininas en la primera mitad del siglo XX fueron claves para el desarrollo de las técnicas del cultivo *in vitro*.

En la actualidad, el cultivo *in vitro* engloba un conjunto de técnicas cuyos objetivos son la producción de plantas (micropropagación), el saneamiento vegetal (cultivo de meristemos o microinjerto) y la mejora genética. Dentro de este último objetivo se puede utilizar el cultivo *in vitro* para lograr distintas aplicaciones: obtención de haploides y doble-haploides mediante cultivo de anteras u ovarios, obtención de híbridos interespecíficos mediante rescate de embriones o fusión de protoplastos, aumento de la variación intraespecífica mediante el aprovechamiento de la variación somaclonal y obtención de plantas transgénicas mediante, por ejemplo, transformación indirecta con *Agrobacterium*.

Mientras los tipos de mutaciones mencionadas anteriormente (espontáneas o inducidas por métodos físicos o químicos) modifican parte del genoma de la planta sin que se pueda saber fácilmente qué gen o genes se han visto afectados, gracias a la utilización de la mutagénesis insercional, cuyo agente mutagénico es un fragmento de ADN de secuencia conocida, el gen alterado queda etiquetado por lo que es más sencillo llegar a su identificación y clonación.

Las técnicas de transformación genética más utilizadas son la transformación indirecta con *Agrobacterium tumefaciens* y el método biobalístico mediante el bombardeo de células vegetales con partículas recubiertas con ADN. Aunque existen métodos de transformación puestos a punto por ambas vías en tomate, el más utilizado es, sin duda, el cocultivo de explantes primarios con *Agrobacterium* (Baum *et al.*, 1997; Pineda, 2005). Los vectores que se han utilizado para obtener los mutantes insercionales de tomate son los transposones y, sobre todo, el T-DNA.

1.4.1 Transposones

Los trabajos de McClintock en maíz en los años 40 y 50 del siglo pasado revelaron la existencia de secuencias móviles en el genoma que fueron denominadas transposones por su capacidad de duplicarse y cambiar su posición. Después de identificar las secuencias *Ac* y *Ds*, que son responsables para su translocación e integración en el cromosoma (Fedoroff *et al.*, 1983), fue posible aplicar este sistema a otras especies como *Arabidopsis thaliana* (van Sluys *et al.*, 1987), patata (Knapp *et al.*, 1988), tabaco (Hehl y Baker, 1990) y arroz (Enoki *et al.*, 1999).

Se ha demostrado que este sistema también funciona en tomate (Yoder *et al.*, 1988; Yoder, 1990; Osborne *et al.*, 1991; Rommens *et al.*, 1992; Carroll *et al.*, 1995). Con esta aproximación, se han podido clonar genes que confieren resistencias a diferentes razas de *Cladosporium fulvum* (Jones *et al.*, 1994; Takken *et al.*, 1998) y el virus del mosaico del tomate (Lanfermeijer *et al.*, 2003). Se identificaron también los genes *Dwarf*, que codifica un citocromo P₄₅₀ (Bishop *et al.*, 1996), *DCL* (*DEFECTIVE CHLOROPLASTS AND LEAVES*), que participa en el desarrollo de los cloroplastos y el parénquima en empalizada (Keddie *et al.*, 1996), *FEEBLY*, que tiene funciones en el metabolismo y desarrollo (van der Biezen *et al.*, 1996), *DEM* (*DEFECTIVE EMBRYO AND MERISTEMS*), que organiza el tejido apical durante el desarrollo de los embriones y la división celular en el meristemos de la raíz (Keddie *et al.*, 1998) y *TAP3*, que codifica un factor de transcripción de la familia MADS-box necesario para la especificación de la identidad de pétalos y estambres (Meissner *et al.*, 2000). Recientemente, Carter y colaboradores (2013) utilizaron este sistema en combinación con la técnica de activación transcripcional para generar más de 500 líneas independientes que únicamente contienen elementos *Ds*. Aparte de su utilidad para investigar mutantes presentes en esta colección, la población creada puede servir como base para completar el mapa del genoma de tomate con las localizaciones de elementos *Ds*.

Aunque se han conseguido resultados muy interesantes, tanto con el sistema *Ac/Ds* como con otros parecidos basados en los transposones, esta estrategia tiene ciertas desventajas y limitaciones. En maíz (Greenblatt, 1984; Dooner y Belachew, 1989), tabaco (Jones *et al.*, 1990; Dooner *et al.*, 1991) y *Arabidopsis* (Keller y Dooner, 1993) se observó que los elementos móviles tienden a transponerse en posiciones cercanas a su lugar de origen, es

decir, su inserción no es del todo aleatoria. Otro problema es la posibilidad de que los transposones no sean inserciones estables y cambien su posición a lo largo de varias generaciones, como se observó en *Arabidopsis* (Goodrich *et al.*, 1997).

1.4.2 T-DNA

El uso de T-DNA evita los dos problemas comentados anteriormente y, además, la inserción de un menor número de copias facilita la identificación del gen modificado que causa la alteración fenotípica (Radhamony *et al.*, 2005). La técnica se basa en la capacidad de ciertas bacterias parásitas del género *Agrobacterium* de infectar una amplia gama de plantas con un plásmido portador de la región T-DNA y causar la formación de agallas donde se producen varios tipos de opinas, derivados de amino ácidos y azúcares que le sirven para su nutrición (Escobar y Dandekar, 2003). Después de la identificación de *A. tumefaciens* como causante de la infección en 1907 (Smith y Townsend), en los años 40 se descubrió que el agente tumoral puede actuar aunque ya no esté presente la bacteria (Braun, 1941,1950; Braun y White, 1943). En 1974 se identificó al plásmido Ti como el responsable de esta formación de tumores (Zaenen *et al.*, 1974).

Para usar este plásmido como vector para la transformación genética fue necesario demostrar que existe la posibilidad de incorporar DNA proveniente de otros organismos en el genoma de plantas (Ledoux, 1964) y que el DNA del plásmido está presente en las células vegetales de los tumores (Chilton *et al.*, 1977). El proceso de transferencia del T-DNA no es completamente conocido y resulta demasiado complejo para describirlo en detalle. Básicamente, se pueden diferenciar varios pasos que incluyen la infección de la planta con *A. tumefaciens* y la activación de varios genes *vir* relacionados con la virulencia del plásmido. Estos genes *vir* inician la reproducción del plásmido, la transferencia del T-DNA, que pasa a la célula vegetal en una sola hebra, y su integración en el genoma de la planta (Barampuram y Zhang, 2011). Para transformar plantas con genes de interés mediante este sistema es necesario modificar el DNA que se introduce gracias a técnicas de DNA recombinante. En este proceso se eliminan los genes que inducen la formación de las agallas y la síntesis de opinas y se insertan los genes de interés entre los dos bordes del T-DNA. Desde su primera implementación en tabaco (Zambryski *et al.*, 1983) y las primeras transformaciones estables

(DeBlock *et al.*, 1984; Horsch *et al.*, 1984), este método se ha aplicado a una multitud de especies con una amplia gama de construcciones.

Una vez dilucidado el mecanismo de infección de *Agrobacterium* y del plásmido Ti como vector, fueron tres los avances adicionales que permitieron su empleo a gran escala y de forma rutinaria. Mientras en los primeros trabajos de transformación se utilizaron protoplastos, el desarrollo de protocolos de regeneración a partir de diferentes tejidos vegetales permitió el uso de T-DNA en multitud de especies y por nuevos grupos de trabajo (Thorpe, 2007). La segunda mejora se centró en los vectores. El desarrollo de vectores binarios que utilizaron *E. coli* como huésped intermediario para la multiplicación de las secuencias de interés en el plásmido Ti y su integración posterior a *A. tumefaciens* facilitó la disponibilidad de una gran variedad de cepas de *A. tumefaciens* y tipos de plásmidos (Lee y Gelvin, 2008). La utilización de mejores genes marcadores que facilitan la selección de las células transformadas y genes delatores que permiten seguir el proceso de transformación, fue el tercer avance que convirtió esta metodología en una herramienta estándar en la genética de plantas (Miki y McHugh, 2004).

Aunque, en teoría, la inserción del T-DNA en el genoma de una planta es aleatoria (Franzman *et al.*, 1995), resultados con *Arabidopsis thaliana* y varias especies de *Nicotiana* indican que el T-DNA suele integrarse con preferencia en regiones transcricionalmente activas (André *et al.*, 1986; Koncz *et al.*, 1989; Herman *et al.*, 1990). En tomate se observó también que el sitio de inserción tiende a ocurrir en secuencias que se transcriben (Gidoni *et al.*, 2003). En otros trabajos con *Arabidopsis* se ha observado que existe una preferencia de inserción en regiones intergénicas (Sessions *et al.*, 2002; Alonso *et al.*, 2003) así como en zonas ricas en pares de nucleótidos AT (Brunaud *et al.*, 2002; Qin *et al.*, 2003). Sin embargo, lo que se ha observado en arroz es que el mayor número de eventos de inserción suele ocurrir cerca del codón de inicio (An *et al.*, 2003; Chen *et al.*, 2003; Sallaud *et al.*, 2004).

Conviene destacar que estas observaciones pueden estar causadas por el sistema de selección (p.ej.: resistencia a un antibiótico o herbicida) que elimina aquellos eventos de integración que no se expresan y que pueden estar ubicados en otros sitios del genoma de la planta. En cualquier caso, la amplia distribución de los insertos a lo largo del genoma, su baja frecuencia de integración en regiones repetidas y su preferencia por zonas codificantes le convierten en un agente mutagénico idóneo.

Por otra parte, existen una serie de limitaciones o inconvenientes que acompañan a este método. En varios trabajos con *Arabidopsis thaliana* se observó que no existía cosegregación entre un marcador molecular y el gen causante del fenotipo mutante (Meinke *et al.*, 1994; Azpiroz-Leehan y Feldmann, 1997). Esto puede ser debido a diferentes causas, como inserciones incompletas del T-DNA, inserciones del cuerpo del vector (Hermann *et al.*, 1990; Tinland, 1996; Kononov *et al.*, 1997; Fu *et al.*, 2000) o del genoma de *Agrobacterium* (Peterhans *et al.*, 1990; Svitashv y Somers, 2002). Además, la integración del T-DNA en el genoma vegetal puede provocar mutaciones secundarias a nivel génico y estructural. Estas mutaciones pueden ser puntuales (Negruk, 1996) o eventos de translocación y duplicación (Castle *et al.*, 1993; Laufs *et al.*, 1999; Tax y Vernon, 2001).

1.4.3 Vectores específicos para la identificación de genes

Con el fin de aprovechar al máximo el esfuerzo que conlleva la obtención y evaluación de una colección de plantas transgénicas para la identificación de mutantes insercionales, se han desarrollado una serie de vectores específicos que aportan un valor añadido en el contexto de esta metodología.

Los vectores que producen una activación transcripcional generan mutantes en los que los genes afectados están sobreexpresados. Esto se consigue mediante la utilización de un vector que contiene múltiples copias de un promotor. El más utilizado es el 35S CaMV, un promotor constitutivo fuerte derivado del virus del mosaico de la coliflor (Odell *et al.*, 1985; Kay *et al.*, 1987; Hayashi *et al.*, 1992) cuya inserción en las proximidades de un gen endógeno aumenta el nivel de expresión de este gen. Adicionalmente existen construcciones a base de promotores específicos que se activan en estadios de desarrollo o tejidos determinados (Twell *et al.*, 1990; Weigel *et al.*, 2000). Al igual que sucede con otro tipo de inserciones, la integración dentro de un gen resulta en la anulación o alteración de su función. La gran ventaja de este sistema es que permite la identificación y estudio de genes cuya anulación de función no resulta en un fenotipo alterado.

En tomate, Matthews y colaboradores (2003) generaron una colección de 10.427 líneas transgénicas con una construcción de activación transcripcional que portaba 4 copias del intensificador 35S. En esta población se detectaron 1338 líneas con alteraciones fenotípicas,

destacando una con órganos morados y un elevado contenido de antocianinas que más tarde dio lugar al descubrimiento del gen *ANT1*. De 1014 líneas que no dieron un fenotipo alterado en la T0, un 10 % (103) mostraron alteraciones en su descendencia, indicando posibles eventos de pérdida de función y la relevancia que siguen teniendo los mutantes *knock-out* en este tipo de experimentos.

Además de las ventajas y desventajas anteriormente descritas, la activación transcripcional tiene algunas limitaciones intrínsecas. Si hay interferencias con genes que controlan procesos no relacionados (Riechmann y Ratcliffe, 2000) o si un promotor causa la co-expresión de genes vecinos (Williams y Bowles, 2004) puede ser difícil establecer la relación entre el fenotipo observado y la función del gen afectado. Conviene destacar también que los promotores pueden ejercer su efecto en ambos sentidos respecto de su lugar de integración y a una distancia considerable del gen alterado, hecho que puede dificultar la identificación del mismo (Weigel *et al.*, 2000). Además, la integración de un vector de este tipo corriente arriba de varios genes situados en tándem puede provocar, al menos en teoría, la sobreexpresión de algunos de ellos, lo que va a dificultar la interpretación de este tipo de eventos. En todo caso, el problema más habitual es que la excesiva sobreexpresión de un gen puede provocar la activación de un proceso de silenciamiento postranscripcional, lo que conduce a un fenotipo de anulación de función, es decir, el resultado contrario a lo esperado.

Una alternativa a la activación transcripcional son las trampas génicas. El sistema fue desarrollado en *Drosophila* (O'Kane y Gehring, 1987) y enseguida adaptado para su uso en plantas. A partir de construcciones que fueron diseñadas para estimar la frecuencia de inserciones de T-DNA y que portaban únicamente la secuencia codificadora de un gen de resistencia a un antibiótico sin un promotor (André *et al.*, 1986; Teeri *et al.*, 1986), se diseñaron vectores que incluyeron, aparte del marcador, un gen delator para la visualización de la expresión mediante tinción histoquímica (Fobert *et al.*, 1991; Kertbundit *et al.*, 1991; Topping *et al.*, 1991). La ventaja principal de esta estrategia reside en la naturaleza dual de las trampas, ya que por un lado generan mutaciones de inserción de T-DNA y por otro permiten estudiar el patrón de expresión del gen etiquetado. Así, no sólo se facilita el estudio del gen afectado en base a su fenotipo, sino que también se puede inferir cuál es su patrón de expresión en función de la información que aporte el patrón de expresión del

delator. También existe la posibilidad de que no solo el gen quede etiquetado, sino que se produzca adicionalmente una fusión traduccional entre el delator y el producto del gen endógeno, permitiendo su localización intracelular.

En función de modificaciones en esta estructura básica se diferencian tres tipos de trampas que se distinguen por la construcción que acompaña al gen delator. En las trampas de intensificadores la secuencia codificadora del gen delator está fusionada a un promotor mínimo, normalmente una caja TATA y un inicio de transcripción. Este promotor por sí solo no puede inducir la expresión del gen delator; por tanto, necesita que se produzca la inserción en las cercanías de un intensificador endógeno para su activación. Las trampas de promotores y genes contienen un gen delator sin ningún tipo de promotor propio y su expresión depende de la inserción dentro de un gen y no sólo en su vecindad. Mientras las trampas de promotores deben insertarse en uno de los exones para que se exprese el gen delator (ya que el único promotor que puede activar su expresión es el del gen endógeno), las trampas de genes contiene un sitio aceptor de *splicing* justo antes de la región estructural del delator y, por tanto, sólo funcionan si se integran en un intrón (Springer, 2000).

Debido a estas ligeras diferencias en el diseño, se pueden obtener diferentes resultados con los tres tipos de trampas. Gracias a la presencia de un promotor mínimo, las trampas de intensificadores suelen tener una frecuencia elevada de expresión en comparación con las otras dos construcciones que tienen que integrarse en un gen para su funcionamiento. Por otro lado, debido a las largas distancias a las que son capaces de actuar los intensificadores, la identificación de los genes puede ser más difícil, ya que, para que funcione la trampa, no es necesario que el gen quede etiquetado de forma estricta. En teoría, la gran ventaja de las trampas de promotores o genes sobre la de intensificadores no es otra más que la etiqueta está estrechamente ligada al gen afectado, lo que facilita su identificación. Comparando la eficacia, Kertbundit y colaboradores (1991) y Topping y Lindsey (1997) revelaron que la proporción de insertos que resultan en la expresión del gen delator estaba al torno al 25 % usando una trampa de promotores, y 50 % con una trampa de intensificadores. Pese a lo indicado, conviene resaltar que la trampa de intensificadores puede funcionar como una trampa de genes o promotores si se inserta correctamente en un intrón o un exón. En definitiva, evaluando los pros y los contras, en nuestra opinión, la trampa de intensificadores es más versátil.

La utilización de este tipo de trampas conlleva varias ventajas en comparación con otros sistemas de mutagénesis insercional. Para estudiar los efectos de un gen no es necesario que muestre un fenotipo alterado, ya que puede ser suficiente apreciar las modificaciones sutiles que solamente se manifiesten en un contexto espacial o temporal muy reducido. Esta situación permite además la observación de alteraciones de genes redundantes, cuyos fenotipos por eventos de disrupción génica serían ocultados por genes que cumplen la misma función, o una función análoga. En la situación opuesta, si el gen afectado tiene una función vital, y su disrupción o presencia en homocigosis resulta en la muerte del individuo, el uso de delatores facilita su estudio. Por ejemplo, el gen *PROLIFERA (PRL)* de *Arabidopsis*, que codifica una proteína de la familia MCM relacionada con la iniciación de la replicación de DNA esencial durante distintos estadios de desarrollo del embrión y megagametofito, fue identificado mediante *trapping* (Springer *et al.*, 1995; 2000).

Por otra parte, la expresión del gen delator ayuda en la determinación de las diversas funciones de genes con efectos pleiotrópicos o que actúan en diferentes estadios del desarrollo. La posibilidad de detectar la activación puntual de un gen depende de la sensibilidad del delator. En este sentido, conviene resaltar que es posible observar su expresión hasta en unas pocas células (Lindsey *et al.*, 1993). De esta manera se evita descartar genes que, pese a su baja expresión, tienen efectos muy relevantes. Un ejemplo paradigmático es el gen *OVATE*, que convierte la forma redonda del fruto del tomate en piriforme y que se expresa de forma detectable sólo en órganos generativos y por poco tiempo (Liu *et al.*, 2002).

En esta Tesis doctoral se ha utilizado, como en la mayoría de trabajos similares, el sistema GUS que consiste en la interacción de la proteína codificada por el gen bacteriano *uidA* con diferentes sustratos como beta-glucuronidasa resultando en una tinción del tejido (Jefferson *et al.*, 1987). Su capacidad de reaccionar aún estando fusionado a otras proteínas permite no sólo su detección, sino además su localización y, a veces, una estimación cuantitativa del producto del gen. Sus principales inconvenientes respecto de otras alternativas serían el elevado precio de los sustratos que son necesarios para analizar su expresión, la naturaleza destructiva del ensayo que impide su uso en tejidos vivos y la presencia de ciertas enzimas propias del material vegetal que pudieran dar falsos positivos por actuar de la misma forma que el producto del gen delator. A pesar de estas desventajas, existen múltiples ejemplos en

los que el sistema GUS ha sido una herramienta de elevada utilidad para el estudio de los genes identificados (Springer *et al.*, 1995; Gu *et al.*, 1998; Campisi *et al.*, 1999; Swaminathan *et al.*, 2000; Chen *et al.*, 2003; Atarés *et al.*, 2011).

Las trampas génicas se han podido transferir al material vegetal mediante el empleo de transposones (Fedoroff y Smith, 1993; Klimyuk *et al.*, 1995; Sundaresan *et al.*, 1995) y mediante el T-DNA de *Agrobacterium tumefaciens* (Kertbundit *et al.*, 1991; Topping *et al.*, 1991; Lindsey *et al.*, 1993; Babiychuk *et al.*, 1997; Campisi *et al.*, 1999). Con esta estrategia se han creado grandes poblaciones de plantas transgénicas de varias especies. En *Arabidopsis* se han identificado genes y secuencias reguladoras de genes que intervienen en la germinación (Liu *et al.*, 2005), la diferenciación estructural en embriones (Topping y Lindsey, 1997), la formación de raíces laterales y adventicias (Smith y Fedoroff, 1995; Malamy y Benfey, 1997), la formación de pétalos y estambres (Nakayama *et al.*, 2005), la respuesta a la infección por nemátodos (Barthels *et al.*, 1997), la respuesta a estreses abióticos (Alvarado *et al.*, 2004) y procesos celulares durante la senescencia (He *et al.*, 2001). También se descubrieron promotores específicos de la embriogénesis (Topping *et al.*, 1994), células guarda (Plesch *et al.*, 2000), hojas jóvenes (De Greve *et al.*, 2001) y raíces (Mollier *et al.*, 2000). Además, gracias al empleo de estas trampas se han podido identificar y clonar diferentes genes como *POLARIS* (Casson *et al.*, 2002), *FRUITFULL* (Gu *et al.*, 1998) y *EXORDIUM* (Farrar *et al.*, 2003).

En arroz, se han generado varias colecciones de líneas *trapping* (Jeon *et al.*, 2000; Jeong *et al.*, 2002; Sallaud *et al.*, 2003; Wu *et al.*, 2003; Ryu *et al.*, 2004; Sallaud *et al.*, 2004; Yang *et al.*, 2004; Peng *et al.*, 2005). Gracias a la disponibilidad de estas colecciones, se han identificado y caracterizado mutantes deficientes en clorofila (Jung *et al.*, 2003), el regulador de desarrollo de polen *RIP1* (Han *et al.*, 2006), genes implicados en el desarrollo del tapete (Jung *et al.*, 2005), la producción de ceras en las paredes de las anteras (Jung *et al.*, 2006), la resistencia contra *Xanthomonas oryzae* (Mori *et al.*, 2007), la acumulación de hierro (Lee *et al.*, 2009), el desarrollo floral (Lee *et al.*, 2010) y varios miembros de la familia de los genes MADS-box que influyen en la respuesta a la duración del día (Ryu *et al.*, 2009).

A menor escala, se han utilizado las trampas génicas en otras especies, como por ejemplo *Lotus japonica* (Webb *et al.*, 2000), *Medicago truncatula* (Scholte *et al.*, 2002), *Salvia miltiorrhiza* (Lee *et al.*, 2008), *Brachypodium distachyon* (Vain *et al.*, 2008), *Brassica rapa*

(Lee *et al.*, 2004), álamo (Harrison *et al.*, 2007), cebada (Zhao *et al.*, 2006) y fresa (Oosumi *et al.*, 2006).

Meissner *et al.* (2000) fueron los primeros que combinaron la técnica de los transposones con una trampa de promotores en tomate. En el escrutinio de las descendencias identificaron varios mutantes y la actividad del delator en diferentes órganos como los tejidos vasculares, frutos, raíces, hojas y tallos. El primer gen caracterizado con un programa de *activation tagging* en tomate fue *ANT1* que es un regulador transcripcional que participa en la síntesis, modificación y el transporte de antocianinas (Mathews *et al.*, 2003).

1.5 Los estreses abióticos: sequía y salinidad

Asumiendo el reto de asegurar la alimentación de una población mundial creciente, uno de los caracteres donde se esperan más éxitos en la mejora genética vegetal es el de la tolerancia a estreses abióticos. Entre ellos, el estrés hídrico y la salinidad son los más significativos y amenazadores. Por un lado, más de la mitad de las tierras cultivables están clasificadas como áridas o susceptibles para la sequía. Por otro, se presupone que un 6 % de toda la tierra firme está afectada por altos contenidos en sales, representando aproximadamente un total de 800 millones de hectáreas. La mitad de esta superficie se ve afectada por salinidad y la otra mitad por sodicidad (Munns, 2005). Para la producción de alimentos se utilizan unos 1700 millones de hectáreas, repartidas en 1500 millones sin riego y otras 230 bajo riego. En base a un estudio de Oldeman y colaboradores (1991) la FAO estimaba que un 2 % (32 millones de hectáreas) de la primera categoría han sufrido una degradación por salinización secundaria y que en tierras con riego el porcentaje alcanza alrededor del 20 % (45 millones de hectáreas). Anualmente se pierden entre 1 y 1,5 millones de hectáreas cultivadas debido a esta degradación (Umali, 1993) y se estima que la reducción en la productividad corresponde a un valor de 12.000 millones de dólares cada año (Ghassemi *et al.*, 1995).

Aparte de la reducción de ingresos, esta tendencia constituye un problema prioritario en la agricultura y puede generar conflictos por los recursos de agua, cada vez más necesarios debido al crecimiento continuo de la población mundial (Mittler y Blumwald, 2010). Casi un 70 % del agua extraída se gasta actualmente en la agricultura. A este dato cabe sumarle otro

no menos impactante: en los últimos 70 años, la población mundial se ha triplicado, pero el uso de agua para labores agrícolas se ha multiplicado por seis (Pimentel *et al.*, 2004; UN, 2011). Con el esperado crecimiento de 7.000 millones de habitantes a 9.000 millones en 2050, la alimentación mediante un uso de recursos en condiciones cada vez menos favorables es un reto enorme.

La implementación de nuevas técnicas como el riego por goteo para reducir el consumo de agua y la acumulación de sales o la desalinización de agua, que hoy en día solamente aporta el 1% del agua consumida, puede resolver parte del problema. La otra parte tiene que estar basada en la obtención de nuevas variedades con una reducida necesidad de agua y mayor tolerancia a la salinidad (Kijne *et al.*, 2003; Yamaguchi y Blumwald, 2005). Aunque existe la discusión de si las respuestas de las plantas a estos estreses son realmente caracteres complejos (Blum, 2011), en la mayoría de los casos los grandes esfuerzos para lograr variedades tolerantes todavía no han dado los resultados esperados. Esto puede ser debido parcialmente al hecho de que aún no se conocen muchos aspectos de las bases fisiológicas y genéticas de la tolerancia a estos estreses (Bartels y Sunkar, 2005; Munns y Tester, 2008).

El estrés hídrico y salino tienen algunos efectos comunes a nivel fisiológico aunque estén causados por factores ambientales diferentes. En ambos casos, la primera consecuencia para la planta es el problema de absorber agua, sea debido a su ausencia o por el alto contenido de iones que aumentan la presión osmótica y dificultan la absorción de agua por la raíz. Como reacción inicial, la planta acumula solutos para mantener el volumen y la turgencia celular mediante un ajuste osmótico que permita la absorción de agua y el mantenimiento de las funciones vitales (Zhu, 2002). Adicionalmente, el estrés salino presenta un segundo efecto: la acumulación de iones salinos cuyos efectos tóxicos requieren mecanismos para su compensación (Munns, 2002). Debido a esta circunstancia, se suele dividir la respuesta al estrés salino en dos fases. La primera consiste en una respuesta rápida al estrés osmótico, caracterizada por un retraso en el desarrollo de nuevas hojas, y la segunda en una reacción a la toxicidad de los iones salinos, que causa una senescencia acelerada en las hojas viejas. Como consecuencia, la adaptación de las plantas se define por su tolerancia al estrés osmótico y por su capacidad de excluir, compartimentar o tolerar la presencia de iones salinos (Munns y Tester, 2008).

La mayor o menor influencia de cada uno de estos procesos sobre el nivel de tolerancia que manifiesta una planta depende del estadio de desarrollo de la planta, su genotipo y el nivel de estrés aplicado. En función de estos tres factores es posible que los efectos osmóticos persistan durante la segunda fase, o que la toxicidad se manifieste en la primera, por ejemplo, en los casos de plantas susceptibles a elevadas concentraciones de iones salinos (De Costa *et al.*, 2007; Muñoz-Mayor *et al.*, 2008). Debido a la complejidad de los mecanismos implicados y las diferencias de funcionamiento según los factores comentados, se hace imprescindible estudiar estos procesos desde la mayor cantidad de abordajes posibles: planta entera, tejidos, células, mecanismos fisiológicos o moleculares, etc. (Munns, 2002; Borsani *et al.*, 2003; Tester y Davenport, 2003; Munns, 2005; Munns y Tester, 2008). Además, esta complejidad tiene como consecuencia la necesidad de estudiar este proceso desde diferentes puntos de vista y con diseños experimentales variados. De esa forma se podrá mejorar el conocimiento sobre los mecanismos que hacen que una planta sea tolerante o sensible a un estrés y, como consecuencia, se podrán establecer estrategias para su mejora.

En este trabajo se ha utilizado una colección de líneas T-DNA de tomate y de una especie silvestre relacionada (*Solanum pennellii*) para identificar mutantes afectados en su nivel de tolerancia a estreses abióticos como la sequía y la salinidad. Para ello, se han realizado tanto evaluaciones *in vitro* (en condiciones axénicas) como evaluaciones *in vivo* (en invernadero). Aunque un escrutinio *in vivo* tiene la ventaja de ofrecer unas condiciones más similares a las que las plantas se enfrentan normalmente, esta aproximación conlleva varias desventajas. Aparte de elevados requerimientos con respecto a espacio y tiempo de evaluación, la variabilidad de las condiciones ambientales reduce la reproducibilidad de los experimentos. En un invernadero se puede controlar el suministro de agua y ofrecer un sustrato más o menos homogéneo para el cultivo, pero la intensidad de iluminación y la temperatura, así como otros factores climatológicos con un efecto importante suelen tener cierta variabilidad que no se puede controlar (Foolad, 2004; Cuartero *et al.*, 2010). En cambio, los ensayos *in vitro* ofrecen condiciones donde todos estos factores son controlables y reproducibles. Sin embargo, hay que tener en cuenta que el ambiente que se crea *in vitro* puede causar ciertos artefactos o modificar la respuesta. Un ejemplo es la influencia que puede tener la alta humedad ambiental que hay en los recipientes de cultivo *in vitro*. Esta característica puede reducir la transpiración de la planta evaluada y, como consecuencia, influir en su capacidad

de absorción de agua y sales minerales presentes en el medio de cultivo. Además, en casos extremos, podrían aparecer síntomas de hiperhidratación que alteren la respuesta del material vegetal a la presencia de un estrés abiótico (Møller y Tester, 2007; Pineda *et al.*, 2012). A pesar de estos inconvenientes, hay múltiples ejemplos de evaluaciones en cultivo *in vitro* cuyos resultados han sido corroborados en experimentos *in vivo* (Pérez-Alfocea *et al.*, 1994; Cano *et al.*, 1996; Rus *et al.*, 1999). Por tanto, las ventajas de esta metodología en comparación con ensayos *in vivo* la convierten en la más adecuada para un escrutinio inicial en el que se buscan líneas con un comportamiento frente al estrés significativamente diferente del que tiene el material de partida.

Una cuestión clave en este contexto es la selección del tipo de material vegetal con el que se llevan a cabo los experimentos. La respuesta al estrés salino e hídrico suele depender del estadio de desarrollo y, tanto en tomate como en especies silvestres relacionadas, se ha visto que la tolerancia en un estadio del desarrollo no está necesariamente relacionada con la observada en otros (Shannon *et al.*, 1987; Foolad y Lin, 1997; Cuartero y Fernández-Muños, 1998). En trabajos anteriores de nuestro grupo se han realizado evaluaciones de la tolerancia a la salinidad empleando el cultivo de callos desorganizados en presencia de sal (Cano *et al.*, 1996; Rus *et al.*, 2000). Sin embargo, esta estrategia, que puede aportar información sobre la capacidad de crecimiento y división celular en presencia de estrés salino, no permitiría identificar alteraciones en caracteres importantes en la respuesta a nivel de planta entera (p.ej. absorción de sales minerales, transporte floemático, etc.). Por tanto, la alternativa de utilizar el cultivo *in vitro* de ápices (Cano *et al.*, 1998) como estrategia para la evaluación de una colección de líneas mutagenizadas parece la más adecuada. En comparación con la utilización de tejidos desorganizados, este método permite la observación de posibles efectos sobre la formación y el crecimiento de las raíces, la elongación del tallo y el desarrollo de las hojas, lo cual puede dar lugar a descubrimientos con respecto a la absorción, el transporte y la acumulación de iones en estos órganos.

Por otra parte, un aspecto de gran importancia en este contexto es la elección del tratamiento salino para detectar posibles líneas mutantes. En esta elección hay que tener en cuenta, fundamentalmente, dos factores: la concentración de agente selectivo y el momento de aplicación del estrés. Se debe definir, en base a experimentos preliminares con plantas testigo, una concentración adecuada para crear condiciones estresantes que no tengan un efecto demasiado grave, es decir, que provoquen síntomas evidentes respecto de la

ausencia de estrés pero que permitan a la planta mantenerse con vida todo el experimento. De esta forma se pueden identificar tanto mutantes con mayor nivel de tolerancia al estrés como, lo que es más probable, mutantes hipersensibles. Además, para evitar, en la medida de lo posible, que se activen los mecanismos de adaptación de las plantas a estos tipos de estrés, se ha decidido realizar el tratamiento de forma directa y mantenida durante todo el tiempo que dura el experimento. Aunque la aplicación inmediata de la concentración máxima puede acarrear ciertas desventajas, por ejemplo, la plasmólisis de las células de la raíz causada por el cambio drástico del nivel osmótico (Munns, 2002), las ventajas son más importantes, ya que la aplicación paulatina del tratamiento estresante aumentaría en gran medida la dificultad metodológica del escrutinio y, sobre todo, activar mecanismos de adaptación (Freytag *et al.*, 1990; Jain *et al.*, 1990; Winicov, 1996; Lutts *et al.*, 1998).

1.5.1 Respuestas al estrés osmótico

La respuesta instantánea de la planta al estrés hídrico es una reducción del crecimiento vegetativo que afecta más a la parte aérea que a la radicular (Sharp *et al.*, 1988; Munns, 2002). La detención del desarrollo de tallos y hojas no solo reduce la superficie transpiratoria, sino que facilita adicionalmente, como efecto secundario, la acumulación de solutos solubles, una respuesta en relación con el ajuste osmótico (Osorio *et al.*, 1998). Mientras los órganos epigeos exhiben una clara reducción a partir de niveles moderados de estrés, el efecto sobre la raíz es más leve, probablemente por un mecanismo de adaptación para acceder a depósitos de agua a mayor profundidad (Chaves *et al.*, 2002; Bartels, 2005).

Con respecto a la fase reproductiva, se ha observado tanto un adelanto de la floración (Levy y Dean, 1998) como un retraso (Blum, 1996). De elevada relevancia agronómica es la reducción en tamaño, número y peso de frutos y semillas, puesto que son el producto final.

La raíz, como primer detector del estrés hídrico, tiene un papel clave en las reacciones frente a la carencia de agua. El ácido abscísico (ABA) metabolizado en la raíces es el regulador principal encargado del cierre de estomas y la reducción de la fotosíntesis, mecanismos que tienden a reducir el consumo de agua (Schachtmann y Goodger, 2008; Chaves *et al.*, 2009).

Mientras estas estrategias solamente sirven para reducir el consumo de agua, existen otros mecanismos de defensa para mitigar los daños provocados por el estrés hídrico. La

activación del sistema respiratorio con su función de romper compuestos complejos en moléculas más sencillas, tiene la finalidad de generar energía para varios procesos (Haupt-Herting *et al.*, 2001). Uno de ellos es la producción de moléculas que tratan de contrarrestar las especies de oxígeno activo a fin de proteger a la célula de estas sustancias altamente reactivas (Apel y Hirt, 2004). Otro mecanismo para reducir los efectos del estrés hídrico es el ajuste osmótico.

Bajo este término se entiende un mecanismo de protección de las células que se basa en la acumulación activa de solutos durante el transcurso del déficit hídrico (Blum, 1988). Si la reducida absorción de agua resulta en la concentración de solutos de forma pasiva, el ajuste osmótico es una reacción coordinada que procura metabolizar solutos que no perjudican a las estructuras celulares ni la composición o el funcionamiento de las enzimas. Estas sustancias, que se denominan solutos compatibles u osmolitos, pertenecen a diferentes clases de moléculas como los ácidos orgánicos, azúcares, polioles o aminoácidos.

Ejemplos de los ácidos orgánicos son el malato, relacionado con la osmorregulación y el cierre de estomas (Morgan, 1984; Schroeder *et al.*, 2001) y el oxalato, que es el principal osmolito orgánico en la familia de los *Chenopodiaceae*, que contiene varias especies halófitas como, por ejemplo, distintos miembros del género *Atriplex* (Osmond, 1976).

La función de los azúcares, como fructosa y sacarosa, en la respuesta al estrés osmótico no solo es la de un osmolito que reduce el potencial osmótico. Su acumulación también asegura la disponibilidad de carbohidratos que se dejan metabolizar fácilmente y que pueden servir como fuente de energía para otros mecanismos de defensa (Hare *et al.*, 1998).

En la respuesta al estrés hídrico, los polioles tienen una doble función. Por un lado, actúan como osmolitos y facilitan la retención de agua en el citoplasma; por otro, son osmoprotectores que protegen las estructuras y funciones celulares contra los efectos dañinos del estrés hídrico, como por ejemplo, la acumulación de especies de oxígeno activas (Bohnert *et al.*, 1995). Estos mecanismos están descritos tanto para polioles lineales (manitol o sorbitol) como cíclicos (inositol o pinitol) (Nuccio *et al.*, 1999; Streeter *et al.*, 2001).

Dentro del grupo de los aminoácidos y sus funciones en condiciones de estrés abiótico, la prolina es la más estudiada. Aun así, seguimos sin saber si su acumulación es una respuesta a estas condiciones adversas o meramente un producto de las mismas (Ashraf y Foolad, 2007). Al margen de esta controversia, se ha demostrado una relación entre estrés osmótico y su

concentración en varias especies como maíz (Ober y Sharp, 1994), arroz (Hsu *et al.*, 2003), trigo (Nayyar y Walia, 2003) y tomate (Tal *et al.*, 1979; Balibrea *et al.*, 1997; Santa-Cruz *et al.*, 1999; Claussen, 2005). Aparte de su participación en el ajuste osmótico en el citoplasma, se le han asignado funciones como estabilizar enzimas y membranas, "cazar" o secuestrar radicales libres, moderar el potencial de reducción y actuar como agente reductor para la recuperación del metabolismo después de situaciones de estrés (Ashraf y Foolad, 2007). Adicionalmente existen genes relacionados con el estrés salino cuyos promotores contienen elementos que responden a la presencia de prolina (Satoh *et al.*, 2002).

A nivel genético se pueden diferenciar dos clases de genes que participan en la respuesta al estrés osmótico. El primer grupo incluye genes que codifican proteínas estructurales, proteínas con funciones anti-oxidativas, aquaporinas y proteínas de la familia LEA (*late embryogenesis abundant proteins*) (Bailly *et al.*, 2001; Breton *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2006; Shinozaki y Yamaguchi-Shinozaki, 2007). En el segundo grupo se encuentran genes relacionados con factores de activación de transcripción y quinasas de proteínas. Muchas de ellas pertenecen a las familias bZIP, WRKY, MYB o AP2/EREBP y tienen un papel clave en la respuesta a la sequía (Abe *et al.*, 1997; Finkelstein y Lynch, 2000; Bray *et al.*, 2004; Marè *et al.*, 2004; Song *et al.*, 2005). Es previsible que los avances continuos en genética molecular y transformación genética permitan ampliar los conocimientos de las implicaciones metabólicas que conlleva la acumulación de osmolitos en plantas (Lugan *et al.*, 2010).

Con respecto al gasto energético, una forma más económica de disminuir los efectos adversos del estrés hídrico es la acumulación de iones salinos procedentes del sustrato. Raven (1985) estimó que la acumulación de Na^+ en hojas conlleva un coste energético de 3,5 unidades de ATP, mientras que la síntesis de prolina requiere 41 y la de sacarosa 52 unidades. Frente a este ahorro hay que considerar los efectos tóxicos de los iones salinos en el citoplasma y el alto grado de coordinación requerido para su transporte desde el apoplasto a la vacuola a través de la vesiculación de la membrana o mediante un proceso citológico que yuxtapone la membrana del plasma al tonoplasto (Blumwald *et al.*, 2000, Hasegawa *et al.*, 2000).

1.5.2 Respuesta al estrés iónico

El segundo efecto desfavorable causado por salinidad es la acumulación de iones salinos, que alteran no solo la homeostasis de Na^+ y Cl^- , sino también de K^+ y Ca^{2+} (Hasegawa *et al.*, 2000; Rodríguez-Navarro, 2000). Una primera reacción a la presencia de elevadas concentraciones de sal es la reducción del crecimiento tanto de las raíces (Rodríguez *et al.*, 1997) como de las hojas (Munns, 2002). En tomate, el estrés salino puede reducir la biomasa de la parte aérea entre el 50 y 60%, y el área fotosintética entre el 20 y 25%, debido a una reducción del tamaño de las hojas y un retraso en su formación. Sin embargo las raíces no muestran estos efectos (Albacete *et al.*, 2008), al menos aparentemente. En otros cultivos también se ha observado que la interrupción del crecimiento radicular es transitoria y que se recupera relativamente rápido (Rodríguez *et al.*, 1997; Hsiao y Xu, 2000).

Aunque las raíces tienen mecanismos para excluir la mayoría del Na^+ y Cl^- disueltos en la solución del suelo, estos iones se acumulan gradualmente en las hojas. Suponiendo que las plantas transpiran unas 50 veces más agua de la que retienen, las primeras hojas donde se pueden observar los efectos tóxicos debido a una concentración elevada son las más viejas (Wolf *et al.*, 1990; Colmer *et al.*, 1995). Los síntomas asociados a este proceso son el amarilleamiento de las hojas y una senescencia precoz (Munns, 2002).

Los efectos adversos también se manifiestan en los órganos reproductivos disminuyendo la cantidad de semillas (Khatun y Flowers, 1995). Mientras concentraciones moderadas de sal en tomate solamente afectan el tamaño de los frutos, concentraciones más elevadas reducen adicionalmente el número de flores (Cuartero y Fernández-Muñoz, 1998).

A nivel celular el efecto tóxico inmediato de los iones salinos se manifiesta de dos maneras diferentes. Si el transporte de Na^+ y Cl^- a la vacuola deja de funcionar de forma correcta, su acumulación en el citoplasma sucede más rápido debido a su menor volumen y resulta en la inactivación de enzimas así como en la paralización de funciones vitales (Amtmann y Sanders, 1998). Esta inhibición suele ocurrir a partir de 100 mM de NaCl y parece ser que este mecanismo de compartimentación es la diferencia principal entre las especies sensibles y las tolerantes a la sal (Munns, 2002; Yokoi *et al.*, 2002).

El segundo sitio donde los iones salinos causan daños son las paredes celulares. El aumento de la concentración en este orgánulo resulta en la deshidratación y contracción de la célula,

lo cual puede conducir a la muerte de la misma. Justamente esta acumulación en el apoplasto es la causa de la pérdida de turgencia de las hojas que se puede observar en muchas especies vegetales, entre ellas el tomate (Neumann *et al.*, 1988; Flowers *et al.*, 1991, Romero-Aranda *et al.*, 2006).

Aparte de estos efectos directos existe una competencia entre el Na^+ y otros cationes como K^+ y Ca^{2+} . Mientras para la mayoría de las plantas el Na^+ no es esencial, el potasio y el calcio tienen funciones importantes en el metabolismo (Grattan y Grieve, 1998; Blumwald, 2000). En condiciones de alta disponibilidad de Na^+ su presencia puede inhibir la absorción por las raíces, competir por el transporte dentro de la planta, las células, o sitios de unión, y alterar por lo tanto la relación entre estos minerales.

El calcio tiene funciones esenciales a la hora de mantener la integridad estructural y funcional de membranas, estabilizar las paredes celulares, controlar el funcionamiento de enzimas y regular la selectividad y el transporte de iones. Los síntomas de deficiencia suelen manifestarse primero en los órganos en desarrollo que compiten por este nutriente y donde una baja tasa de transpiración de agua reduce su disponibilidad. En tomate, una fisiopatía causada por la reducción de la absorción y del transporte del calcio es la podredumbre apical que se caracteriza por la necrosis de la parte distal de los frutos (Ho *et al.*, 1993).

La deficiencia de K^+ causada por altos niveles de Na^+ puede resultar en una reducción del crecimiento y de la producción en varios cultivos, entre ellos el tomate (Lopez y Satti, 1996; Song y Fujiyama, 1996). Estos síntomas pueden estar provocados por la unión directa a los sitios de inhibición o, de manera indirecta, por el desplazamiento de K^+ de los lugares de activación (Serrano, 1996). Como consecuencia de esta competitividad entre los dos iones, la relación entre ellos en el citosol parece ser un factor crítico para evaluar la toxicidad del Na^+ , más que su mera concentración (Cuin *et al.*, 2003).

Esta competencia entre Na^+ y K^+ se refleja también en las múltiples relaciones existentes entre los varios transportadores en los orgánulos de las plantas cuya coordinación es esencial para mantener la homeostasis. Identificados inicialmente como transportadores de potasio, los miembros de la familia HKT están igualmente involucrados en la absorción y distribución de iones Na^+ (Rodríguez-Navarro y Rubio, 2006). En tomate fue posible identificar dos genes, asociados a un QTL que tiene una gran relevancia en la homeostasis de estos dos iones (Asins *et al.*, 2013).

Otro grupo de transportadores que participan como antiportadores en el transporte de K^+ y Na^+ en el tonoplasto y la membrana plasmática pertenecen a la familia NHX (Pardo *et al.*, 2006). El primero se identificó como antiportador vacuolar Na^+/H^+ en *Saccharomyces cerevisiae* (Nass *et al.*, 1997), pero en base a su secuencia fue posible aislar un homólogo en *Arabidopsis thaliana* que se denominó *AtNHX1* (Apse *et al.*, 1999). Según Zhang y Blumwald (2001) las plantas de tomate que sobreexpresan el gen *AtNHX1* acumulan la sal solamente en las hojas y no en los frutos. Conviene comentar, no obstante, que estas observaciones fueron cuestionadas por otros grupos de trabajo (Flowers, 2004; Munns, 2005; Pineda, 2005). En tomate se identificó un transportador parecido y se descubrió que el nivel de expresión de varias isoformas de la secuencia codificadora del gen en presencia de sal en *S. pimpinellifolium* es más elevado que en un cultivar de tomate sensible, mientras que en ausencia de estrés no se detectaron diferencias significativas (Venema *et al.*, 2003; Gálvez *et al.*, 2012).

Del mismo origen, *Saccharomyces cerevisiae*, pero con una función contraria a *AtNHX1*, la reducción de la acumulación de Na^+ en las hojas, se identificó otro grupo de genes implicados en la tolerancia al estrés salino que se denominaron *HAL* (Gaxiola *et al.*, 1992). Dentro de la familia, *HAL1* es el más estudiado y fue posible transferirlo a cultivos como melón (Bordas *et al.*, 1997), tomate (Gisbert *et al.*, 2000) y sandía (Ellul *et al.*, 2003). En estos estudios se reveló que el gen *HAL1* aumenta la tolerancia tanto en callos como en plantas cultivadas a distintos niveles salinos y que su forma de actuar es parecida a la que previamente se había observado en levadura (Serrano, 1996). La reducida acumulación de Na^+ en las hojas está relacionada con una elevada síntesis y almacenamiento de solutos orgánicos en las hojas. Esta forma de mantener el balance osmótico es una forma energéticamente costosa, pero resultó en tomate en una menor pérdida de peso de fruto en presencia de NaCl (Rus *et al.*, 2001; Muñoz-Mayor *et al.*, 2008). Se demostró adicionalmente que otro gen de la familia, *HAL2*, tiene un efecto positivo a la tolerancia al estrés salino en tomate (Arrillaga *et al.*, 1998).

En la membrana plasmática se identificó *SOS1*, un transportador específico de Na^+ , que tiene diferentes funciones. Mientras a niveles moderados de estrés salino, este transportador parece participar en la carga de Na^+ para transportarlo a la parte aérea y almacenarlo en el mesófilo, en presencia de altas concentraciones recupera Na^+ desde el xilema de raíces adultas y restringe su absorción (Shi *et al.*, 2002). Plantas que sobreexpresaban *SOS1* y

fueron sometidas al estrés salino acumulaban menos Na^+ en el xilema y en la parte aérea, lo cual indica que ambos procesos posiblemente ayudan a limitar la acumulación en estos tejidos (Shi *et al.*, 2003). Estos resultados se confirmaron también en tomate con *SISOS1*, el gen ortólogo de *AtSOS1* (Olías *et al.*, 2009a) La expresión de *SOS1* está bajo control del complejo SOS2-SOS3 que se activa por señales transmitidas por calcio (Chinnusamy *et al.*, 2005; Pineda, 2005). SOS3 percibe esta señal y activa la proteína serin/treonina kinasa SOS2 que fosforila al antiportador SOS1 (Halfter *et al.*, 2000). Aparte de esta interacción entre proteínas, SOS2 inicia el antiportador Na^+/H^+ en el tonoplasto que secuestra Na^+ en la vacuola (Shi *et al.*, 2000; Qiu *et al.*, 2002; Quintero *et al.*, 2002;). Adicionalmente SOS2 regula la entrada de Na^+ en el citosol a través del transportador HKT1 (Rus *et al.*, 2001).

Aparte de los genes relacionados con los diferentes transportadores, se identificaron varios reguladores que controlan a nivel transcripcional la respuesta al estrés abiótico. En tomate se describieron las funciones de *TERF1* que, aparte del etileno, responde al ABA en condiciones de sequía (Zhang *et al.*, 2005); *LebZIP2*, que se expresó de forma intensificada en condiciones salinas (Seong *et al.*, 2008); y *AIM1* que esta inducido por patógenos, estrés oxidativo y salino (AbuQamar *et al.*, 2009). En otros miembros de la familia la sobreexpresión de *JERF3* (Wu *et al.*, 2003) y *StEREBP1* (Lee *et al.*, 2007), ambos factores de transcripción activados por etileno, resultaron en una elevada tolerancia de varios estreses, entre ellos la sequía y la salinidad.

Resumiendo, se puede concluir que la tolerancia a los estreses hídrico y salino son caracteres complejos donde interactúan multitud de caracteres y mecanismos. Como suelen ser poligénicos e influidos por el ambiente, su manifestación depende del estado de desarrollo de la planta y el nivel de estrés (Cuartero *et al.*, 2010). Otra consecuencia de este hecho es su baja heredabilidad y la dificultad de identificar todos los procesos involucrados. A pesar de esta complejidad se puede concluir que la minimización de la entrada de NaCl y el mantenimiento de la concentración de iones salinos en el citoplasma a niveles bajos son esenciales para una elevada tolerancia (Munns, 2002). Para conseguir esto, la absorción por la raíz, la carga en el xilema, la localización de iones salinos en algunas partes concretas, como las hojas adultas, y la secreción por la hoja son pasos claves (Tester y Davenport, 2003). Según estos autores, las plantas halófitas son más eficaces en controlar estos procesos, de forma que a bajas concentraciones de sal la acumulación de NaCl es mayor que en glicófitas mientras que a altos niveles se reduce esta tasa y aumenta la discrepancia con

la concentración del medio. Esta estrategia es, justamente, la que aplican las especies silvestres de tomate que exhiben elevados niveles de tolerancia a la salinidad (Santa-Cruz *et al.*, 1999).

1.6 Programa de mutagénesis insercional en *S. pennellii*

Esta tesis se enmarca dentro de otros trabajos de nuestro grupo en los que se está aplicando la mutagénesis insercional en las especies silvestres relacionadas con el tomate (Atarés *et al.*, 2011). Este aprovechamiento de los recursos fitogenéticos relacionados con especies de interés agronómico puede ser de gran utilidad en la búsqueda de genes que permitan la mejora biotecnológica de caracteres como la tolerancia a la sequía y a la salinidad.

C.M. Rick no sólo fue el primero que identificó, en base a sus observaciones en los hábitats originales, el valor de las especies silvestres como *S. pennellii* para la mejora del tomate (Rick, 1973). También fue el primero que abordó la introducción de alelos que confieren mayor tolerancia a la sequía en tomate a través de cruces interespecíficos con *S. pennellii* (Rick 1969, 1982). Con respecto a la salinidad, en 1978 se publicaron los primeros trabajos para estudiar la tolerancia de *S. pennellii* utilizando tanto plantas enteras como el cultivo de callos como aproximaciones metodológicas para su evaluación (Dehan y Tal, 1978; Tal *et al.*, 1978).

Tras estudios recientes se ha comprobado que las características de las diferentes accesiones varían en función de las condiciones ambientales del ecosistema donde se han establecido, lo cual ha provocado la formación de poblaciones aisladas y, por consiguiente, con distintos niveles de tolerancia a estrés de tipo abiótico (Chetelat y Ji, 2006; Albrecht *et al.*, 2009; Nakazato *et al.*, 2010). El descubrimiento de la elevada tolerancia a sequía y altos niveles de sal de la accesión LA716 convirtió este material en el más utilizado para los estudios relacionados con estas características (Jones, 1986). Sin embargo, conviene destacar que algunas de sus características, entre ellas su crecimiento extremadamente lento, dificultan su aprovechamiento para programas de mejora (Foolad, 2007). Posteriormente, tras estudios tanto *in vitro* como *in vivo*, se descubrió que otras accesiones, como "Atico" (Shalata y Tal, 1998; Shalata *et al.*, 2001; Mittova *et al.*, 2004) y PE47 (Bolarín *et al.*, 1991;

Alarcón *et al.*, 1993; Cano *et al.*, 1996, 1998; Santa-Cruz *et al.*, 1999) poseen un elevado grado de tolerancia.

En trabajos previos, Jones y colaboradores realizaron cruces de la accesión LA716 con una línea de tomate sensible a la salinidad y fueron capaces de identificar en la descendencia varios QTL's provenientes de la especie silvestre con efectos significativos en la tolerancia al estrés salino durante la germinación (Foolad y Jones, 1993; Foolad *et al.*, 1997). El grupo de Eshed empleó un método más sofisticado: a partir de los años 90 desarrolló una población de líneas de introgresión de LA716 que representa la totalidad de su genoma segmentado en líneas hermanas de un cultivar de tomate (Eshed *et al.*, 1992, 1995). En base a esta colección fue posible identificar 2975 QTLs que, entre otros caracteres, afectan la morfología, el metabolismo y la producción de biomasa (Lippmann *et al.*, 2007; Kamenetzky *et al.*, 2010). Partiendo de estos QTLs se clonaron *FW2.2*, un gen implicado en el tamaño de fruto, y *Brix9-2-5*, que aumenta el contenido de azúcares en frutos (Frary *et al.*, 2000; Fridman *et al.*, 2000). Con el fin de identificar QTLs relacionados con la síntesis de antioxidantes, Rousseaux y colaboradores (2005) encontraron 20 QTLs, algunos con efectos sobre el contenido del ácido ascórbico y sustancias fenólicas. En un estudio con un enfoque más amplio fue posible hallar 889 *loci* relacionados con el metabolismo de frutos y otros 326 que alteran la producción de frutos (Schauer *et al.*, 2006). Esta colección también facilitó la identificación de 125 QTLs relacionados con la producción de sustancias antioxidantes. Al respecto, conviene resaltar que, entre estos 125 QTLs, 42 se detectaron solo en condiciones salinas, lo que sugiere que cumplen alguna función en la tolerancia frente a este estrés (Frary *et al.*, 2010, 2011). Con el mismo objetivo, Li y colaboradores (2011) encontraron 4 QTLs que influían en la tolerancia al estrés salino en estadio de plántula. Por último, el avance más significativo en esta especie ha sido la reciente secuenciación del genoma completo de *S. pennellii* (Bolger *et al.*, 2014).

Tal y como se ha descrito con anterioridad, la tolerancia a los estreses hídrico y salino se puede basar en adaptaciones y respuestas a distintos niveles. A nivel morfológico se hizo la observación sorprendente de que *S. pennellii* presenta un elevado número de estomas en el haz, lo que le permite aprovechar una de las fuentes principales de humedad en las regiones áridas de los Andes: las nieblas que se forman cuando el aire húmedo del mar sube por las laderas de dichas montañas (Rick, 1973). Aparte de esta particularidad, las hojas muestran una tipología suculenta que se caracteriza por una composición especialmente adaptada de

la cutícula (Bolger *et al.*, 2014; Foolad, 2007;). Esta adaptación contribuye a una mayor eficiencia en el uso del agua, lo cual se refleja en una mayor producción de biomasa por unidad de agua consumida en comparación con el tomate cultivado en condiciones de estrés hídrico (Martin y Thorstenson, 1988). Al comparar el crecimiento en condiciones salinas entre la especie silvestre y cultivares de tomate, *S. pennellii* fue capaz de mantener mejor su crecimiento vegetativo con respecto al número de hojas y masa radicular, mientras la masa foliar se redujo (Cano *et al.*, 1998; Frary *et al.*, 2010). Uno de los mecanismos que contribuye a esto, es la capacidad de evitar la deshidratación que se observó tanto a nivel de planta entera como en estudios realizados con callos (Rus *et al.*, 1999, 2000).

Otras adaptaciones relacionadas con la mayor tolerancia frente a estreses abióticos de *S. pennellii* son la absorción de iones inorgánicos del suelo y su compartimentación en las células (Tal y Shannon, 1983; Bolarín *et al.*, 1991; Pérez-Alfocea *et al.*, 1994). Aunque en condiciones salinas también aumenta la absorción de Na^+ como sustancia osmótica, y posiblemente también como sustituto de K^+ en algunas de sus funciones, esto no tiene efectos tan negativos en lo que respecta a la disponibilidad de Ca^{2+} , K^+ o Mg^{2+} como en el tomate cultivado (Phills *et al.*, 1979; Bolarin *et al.*, 1995; Tahal *et al.*, 2000). Adicionalmente a la sustitución de K^+ por Na^+ , existen mecanismos en las especies silvestres de tomate que controlan la distribución de ambos iones dentro de la planta, de tal manera que el K^+ se transporta a las hojas jóvenes, mientras que el Na^+ se acumula en las hojas viejas (Shannon *et al.*, 1987; Bolarin *et al.*, 1991; Tahal *et al.*, 2000).

La formación de especies reactivas de oxígeno es otra consecuencia negativa del estrés salino, por lo cual la acumulación de antioxidantes para reducir los daños causados por estas sustancias tiene una función clave en la tolerancia. Mientras en condiciones normales de cultivo el tomate presenta un mayor contenido de antioxidantes que *S. pennellii*, en condiciones salinas la especie silvestre aumenta su síntesis de manera más drástica, un cambio que se observó sobre todo en las enzimas antioxidantes (Frary *et al.*, 2010). Varios estudios demostraron las diferencias en la respuesta al estrés salino entre el tomate cultivado y especies silvestres relacionadas. *S. pennellii* aumenta la acumulación de peroxidasas, superóxido dismutasas y ascorbato peroxidasas en reacción a elevados niveles de sal tanto en el citoplasma y los cloroplastos de las hojas (Shalata y Tal, 1998; Mittova *et al.*, 2002a; Koca *et al.*, 2006) como en los plastidios, mitocondrias y peroxisomas de raíces (Mittova *et al.*, 2002b, 2004; Shalata *et al.*, 2001).

Al analizar el nivel de expresión de los primeros genes de tomate relacionados con la respuesta al estrés hídrico (e inducidos por el ácido abscísico) se vio como su expresión permanecía más tiempo activa en plantas de *S. pennellii* que en plantas de tomate. Sin embargo, no se pudo establecer una relación clara entre su transcripción y la elevada tolerancia de las silvestres (Cohen *et al.*, 1991; Plant *et al.*, 1991; Kahn *et al.*, 1993). La mejor adaptación de las especies silvestres a condiciones adversas podría deberse a factores adicionales como polimorfismos alélicos que se perdieron durante la domesticación (Asins *et al.*, 2013; Maron *et al.*, 2013; Mickelbart *et al.*, 2015;).

Por otra parte, Bolger y colaboradores (2014), además de publicar la secuencia del genoma de *S. pennellii*, examinaron la base genética de la elevada tolerancia a estreses abióticos característica de esta especie silvestre. Al analizar la secuencia de 100 genes candidatos, que según los autores están relacionados con el estrés hídrico o salino, la mitad de ellos, aunque no mostraban diferencias significativas en la estructura de las proteínas cuando se compara con las de tomate, sí presentan un alto grado de polimorfismo en la región promotora, lo cual provoca variaciones en sus niveles de expresión. A partir de estos resultados es importante remarcar la importancia que pueden tener las regiones promotoras en este carácter y cómo esto nos puede ayudar a mejorar la comprensión de las respuestas a los estreses abióticos. Por otra parte, Mickelbart y colaboradores (2015) comprobaron que, además de las variaciones en las regiones promotoras, las variaciones alélicas en secuencias codificantes, el número de copias de un gen y los cambios en su función durante la domesticación son claves para entender la biodiversidad y la adaptación a diferentes estreses ambientales. A la vez que estos resultados demuestran la complejidad del carácter, también abren nuevas posibilidades para avanzar en su mejora. Además, en este contexto el estudio de la base molecular de la elevada tolerancia de las especies silvestres adquiere una mayor importancia. Al identificar un gen clave en la respuesta a estos estreses en *S. pennellii* habría que estudiar, no sólo si existen diferencias en la secuencia de la región codificadora sino qué efecto tienen las diferentes regiones promotoras en la expresión de ese gen comparando con su homólogo en tomate.

Como se ha visto en esta introducción, existen conocimientos amplios sobre el tomate, sus especies silvestres, las diversas consecuencias de la sequía o salinidad y los mecanismos relacionados con la tolerancia frente a los efectos negativos asociados tanto a nivel de planta, tejidos, células o moléculas. Aun así, no se ha conseguido mejorar notablemente

estos caracteres o hacer uso de las adaptaciones presentes en los recursos fitogenéticos mediante la mejora clásica. Por lo tanto hay que esperar que los objetivos planteados y los métodos aplicados en esta tesis puedan aportar nuevos conocimientos o técnicas para ayudar a avanzar en este gran reto.

2 Objetivos

Con la finalidad de identificar genes que determinan la tolerancia a la salinidad o controlan diversos caracteres del desarrollo, en nuestro laboratorio se está realizando en cooperación con los grupos de la Dra. Bolarín (CEBAS-Murcia) y del Dr. Lozano (Universidad de Almería) un programa de mutagénesis insercional en tomate y especies silvestres. En relación con este objetivo se han generado diversas colecciones de líneas T-DNA con una trampa de intensificadores en dos variedades de tomate (Money Maker y P73) y en accesiones de especies silvestres relacionadas como *S. pimpinellifolium*, *S. galapagense* y *S. pennellii*. El escrutinio de estas líneas T-DNA ha permitido detectar mutantes alterados en caracteres del desarrollo y en la respuesta al estrés salino que pueden mejorar la comprensión de la base genética de estos caracteres relevantes a nivel agronómico.

La obtención y el análisis fenotípico de mutantes como *sus* (*succulent stamens*), con alteraciones en el desarrollo de pétalos y estambres (Pérez-Martin *et al.*, 2013, Pérez-Martin *et al.*, en prep.), *sog-698* (*sodium gatherer*), que se caracteriza por exhibir una mayor clorosis foliar y síntomas de hiperhidratación debido a una elevada absorción de agua y cambios en la transpiración y la conductancia estomática (Garrido, 2009; Pineda *et al.*, 2011; Egea *et al.*, 2014), o *res* (*restored cell structure by salinity*), que exhibe síntomas de clorosis en condiciones normales y restaura el fenotipo silvestre tras el tratamiento con NaCl (García-Abellán *et al.*, 2015) constituyen los primeros pasos en la comprensión de la función de estos genes. Así mismo, la identificación y clonación de genes como *ALQ/TAGL1* (*ARLEQUIN/TOMATO AGAMOUS-LIKE1*), cuyo carácter más relevante es la conversión homeótica de los sépalos en órganos análogos a un fruto (Giménez-Caminero *et al.* 2010; Pineda *et al.*, 2010; Antón, 2012), *ENO* (*EXCESSIVE NUMBER OF FLORAL ORGANS*), un mutante recesivo que desarrolla frutos acostillados de enorme tamaño (Angarita, 2009; Fernández-Lozano *et al.*, 2015), o *ARS1* (*ALTERED RESPONSE TO SALINITY1*) que responde a la aplicación de sal con síntomas de clorosis y una senescencia prematura (Campos *et al.*, 2015), demuestra la utilidad de la mutagénesis insercional como herramienta para la identificación de genes relevantes.

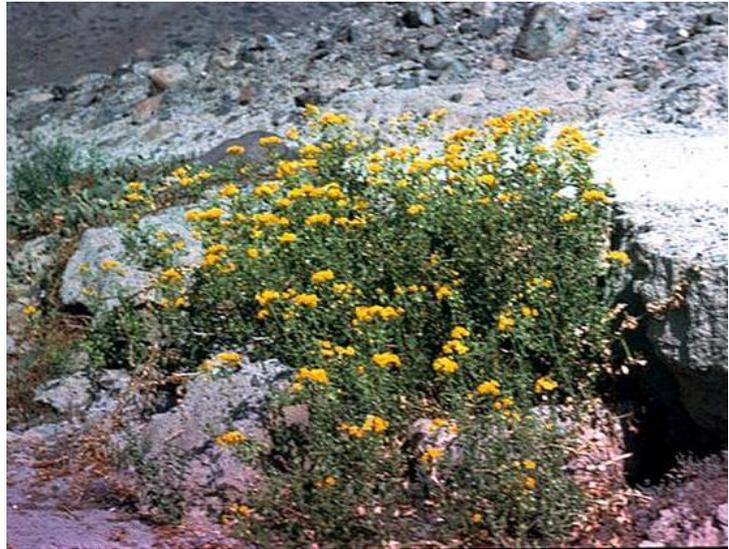
En este marco general, los objetivos planteados para la presente Tesis Doctoral han sido los siguientes:

1. Generación de una colección de líneas T-DNA de *Solanum pennellii* con una trampa de intensificadores.
2. Desarrollo de nuevos métodos *in vitro* e *in vivo* para la detección de mutantes alterados en la respuesta al estrés salino dentro de la colección de líneas T-DNA de *S. pennellii*.
3. Escrutinio de la colección de líneas T-DNA de *S. pennellii* en condiciones de estrés salino con los métodos diseñados.
4. Evaluación en condiciones de estrés salino de algunas líneas T-DNA de *S. lycopersicum*, que habían sido preseleccionadas sobre la base de diversos tipos de alteraciones relacionadas con la respuesta a dicho estrés.
5. Caracterización de algunas líneas T-DNA de *S. pennellii* con alteraciones en caracteres del desarrollo.

3 Material y Métodos

3.1 Material vegetal

El material vegetal empleado para la generación de líneas T-DNA en este trabajo fueron las accesiones de *Solanum pennellii* PE47 y 20164 (amablemente cedida por la Dra. M^a José Díez del COMAV). Esta especie, relacionada filogenéticamente con tomate, tiene frutos verdes y se usa frecuentemente en programas de



mejora por sus características favorables en cuanto a tolerancia a sequía (Rick, 1973), salinidad (Dehan y Tal, 1978; Tal y Shannon, 1983; Taleisnik, 1987; Saranga *et al.*, 1991), resistencia a insectos (Goffreda y Mutschler, 1989) y resistencia a enfermedades (Bournival *et al.*, 1990). Se han elegido las accesiones 20164 y PE47 por su buena respuesta frente al estrés salino. Estos genotipos fueron capaces de crecer durante varios meses con un tratamiento de riego con NaCl 200 mM sin presentar síntomas de marchitamiento o senescencia (Moyano, 2014).

Además, se han utilizado diferentes líneas T-DNA de tomate obtenidas en nuestro grupo de investigación, mediante transformación genética de dos variedades diferentes, la línea P73 y el cultivar Money Maker, ambas utilizadas para el consumo en fresco y bien conocidas por trabajos previos de nuestro grupo.

3.2 Obtención de plantas transgénicas

Las líneas T-DNA de *S. pennellii* se han obtenido mediante el cocultivo de explantes primarios de hoja con *Agrobacterium tumefaciens*.

3.2.1 Técnicas básicas

Antes de abordar un programa de transformación hay que disponer de una serie de técnicas básicas que permitan manejar el material vegetal adecuadamente.

Esterilización de las semillas

El cultivo *in vitro* en condiciones axénicas requiere de una esterilización superficial del material vegetal antes de su implantación. El método aplicado para la esterilización de las semillas de las dos especies es el mismo y consiste en sumergirlas en una solución de hipoclorito de sodio al 5% (lejía comercial diluida a 50%). Para mejorar el contacto con la solución esterilizante se añaden unas gotas de un agente tensoactivo, 7X-0-matic (Flow Laboratories, Inc, Virginia, EEUU). Después de sumergir las semillas durante 30 minutos en esta solución, se realizan tres lavados consecutivos de 5, 10 y 15 minutos en agua destilada estéril para eliminar los restos del agente esterilizante.

Siembra y obtención de plántulas

Las semillas esterilizadas se siembran en placas Petri a las que previamente se han introducido dos hojas de papel de filtro y 7 mL de agua estéril. Las placas se cultivan en una cámara de cultivo a 25°C y oscuridad hasta que las semillas germinan (emiten la radícula). Estas semillas se transfieren a medio de germinación (Tabla 3 y 4) y se mantienen en la cámara de cultivo (25± 2°C; fotoperiodo 16 horas luz / 8 horas oscuridad; 45 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$) hasta que se consigue una plántula con los cotiledones expandidos.

Tabla 3.- Medio de germinación MG

Componente	(g·L ⁻¹)
Solución mineral	MS
Sacarosa	10
Agar	8

- Notas: -El pH del medio se ajusta a 5.7 con KOH y HCl antes de añadir el agente gelificante.
- Los medios de cultivo se esterilizan en autoclave, a 115° C durante 30 minutos.

Tabla 4.- Solución mineral MS (Murashige y Skoog, 1962)

Macronutrientes	(mg·L ⁻¹)
NH ₄ NO ₃	1650
KNO ₃	1900
CaCl ₂ ·2H ₂ O	440
MgSO ₄ ·7H ₂ O	370
KH ₂ PO ₄	170

Micronutrientes	(mg·L ⁻¹)
KI	0,83
H ₃ BO ₃	6,20
MnSO ₄ ·4H ₂ O	22,3
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	8,60
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0,25
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,025
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0,025

FeNa·EDTA	(mg·L ⁻¹)
FeSO ₄ ·7H ₂ O	27,8
Na ₂ ·EDTA	37,3

Propagación clonal de plantas

La propagación clonal tiene por objeto la obtención de plantas genéticamente idénticas a través de la multiplicación vegetativa. Para ello se utilizan como explantes de partida las yemas axilares o el ápice meristemático. El subcultivo de este tipo de estructuras se realiza en el medio I 0.1 (Tabla 5) que permite el enraizamiento y el desarrollo de los meristemas preexistentes. Los recipientes empleados son botes de vidrio de 60 mm de diámetro x 150 mm de altura.

Tabla 5. Medio de enraizamiento I 0.1

Componente	(g·L ⁻¹)
Solución mineral	MS
Sacarosa	20
Myo-inositol	0,1
Tiamina HCl	0,001
Ácido indolacético	0,0001
Agar	8

- Notas:
- El pH del medio se ajusta a 5.7 con KOH y HCl antes de añadir el agente gelificante.
 - Los medios de cultivo se esterilizan en autoclave, a 115° C durante 30 minutos.

3.2.2 Transformación genética de *S. pennellii*

Se siguió el protocolo de transformación descrito en Atarés y colaboradores (2011). A continuación se describen los pasos más importantes de esta metodología.

Obtención de explantes primarios y precultivo

A partir de las yemas axilares introducidas en el medio de enraizamiento, se desarrollan en cinco semanas plantas con un tamaño de entre 10 y 15 cm. Las hojas jóvenes y completamente expandidas de este material vegetal se utilizan como explantes primarios para la transformación. Para ello, se cortan los bordes de los limbos por los cuatro lados y se obtienen unos explantes rectangulares con un tamaño mínimo de 10 mm x 10 mm. El precultivo se lleva a cabo en placas Petri de 90 mm de diámetro con el medio IK 4.0 4.0 + acetosyringona 200 µM (Sigma-Aldrich Co., Missouri, EEUU).

Agrobacterium tumefaciens: cepa bacteriana, plásmido y T-DNA

Las transformaciones genéticas se realizaron con una cepa desarmada de *Agrobacterium tumefaciens* LBA 4404. El vector utilizado fue el pD991 cedido por el Dr. Thomas Jack (Dpto. Ciencias Biológicas, Universidad de Dartmouth). Dentro del T-DNA se encuentra el gen *nptII* (el producto de este gen confiere a las células vegetales la capacidad de resistencia a la kanamicina) bajo el control de las secuencias reguladoras de la manopina sintasa (lo cual produce una expresión constitutiva de dicho gen) y la región estructural del gen *uidA* (gen

delator que codifica para la beta glucuronidasa) fusionada a un promotor mínimo (caja TATA + inicio de transcripción) que no produce niveles de expresión detectables a no ser que se encuentre bajo la influencia de algún intensificador.

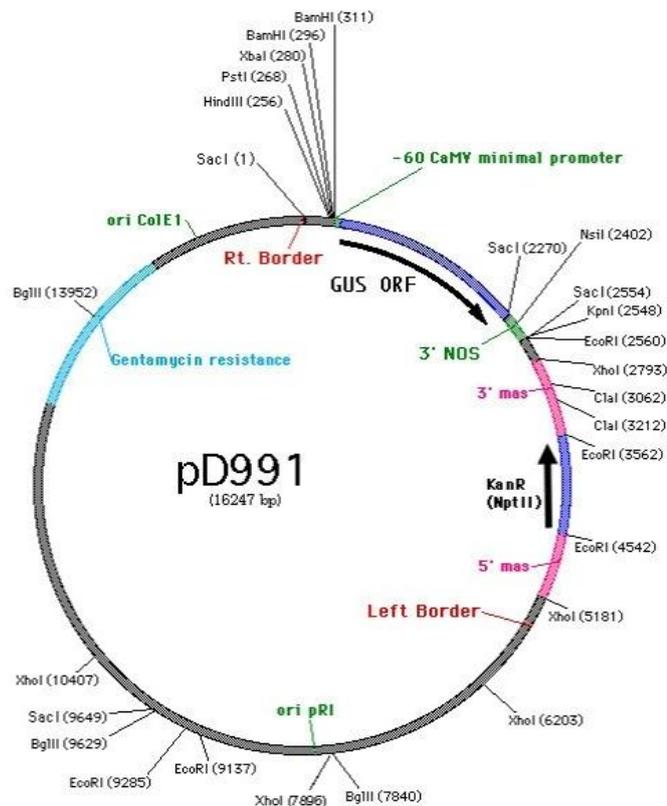
Crecimiento bacteriano

La cepa LBA 4404 de *Agrobacterium tumefaciens* se conserva a largo plazo mediante glicerinado en un congelador a -80°C (Maniatis *et al.*, 1982). Para llevar a cabo una transformación se introduce un inóculo del cultivo glicerinado en

matraces con el medio LB líquido suplementado con $100\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de kanamicina para inhibir el crecimiento de bacterias sin el plásmido binario. Los matraces se colocan en un agitador orbital (230rpm) a 25°C para conseguir el crecimiento de la bacteria. Para la transformación se reparten varias alícuotas de este cultivo inicial en matraces con medio fresco que, además de la kanamicina contiene acetosyringona $200\text{ }\mu\text{M}$. En las mismas condiciones descritas anteriormente se continúa el cultivo hasta que las diluciones alcanzan la densidad adecuada.

Inoculación, cocultivo y eliminación de *Agrobacterium*

Los explantes de hojas de *S. pennellii* se precultivan durante 24 horas en placas Petri con el medio IK 4.0 4.0 + acetosyringona $200\text{ }\mu\text{M}$. Los explantes se sumergen durante 10 min en la suspensión de *Agrobacterium tumefaciens*. A continuación, los explantes se extraen con la ayuda de una malla y se secan sobre papel de filtro estéril para reducir el exceso de bacterias y eliminar los restos del medio de crecimiento bacteriano. Los explantes se colocan de nuevo en el mismo medio con el envés en contacto con el agar. El cocultivo se mantiene durante 48-72 h en condiciones de oscuridad. En esta fase tiene lugar a la transferencia del plásmido Ti a



las células vegetales. Al final de este proceso se realiza un lavado de los explantes sumergiendo éstos en un medio líquido que contiene $500 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de cefotaxima para eliminar los restos del *Agrobacterium* antes de la fase de regeneración.

Regeneración de plantas transgénicas

Tras el lavado, los primeros días los explantes permanecen en placas con un medio IK 4.0 4.0 que adicionalmente contiene $300 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de cefotaxima. Tras este periodo los explantes se subcultivan al medio de inducción de organogénesis (Tabla 6 y 7) al que se le añade timentina ($150 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) para evitar el crecimiento de *Agrobacterium* y kanamicina ($100 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) para restringir el crecimiento de las células no transformadas con el gen *nptII*. Los explantes se subcultivan a medio fresco cada 3-4 semanas hasta que se forman los primeros brotes a partir de los explantes de hoja. Los brotes se individualizan y se transfieren al medio de enraizamiento suplementado con $100 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de kanamicina. La formación de raíces en estas condiciones sirve para confirmar que la planta regenerada es transgénica.

Tabla 6. Medio de inducción de organogénesis IKZ (4.0 4.0 1.0)

Componente	($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)
Solución mineral	MS
Sacarosa	30
Myo-inositol	0,1
TiaminaHCl	0,001
Vitaminas	SH
Ácido indolacético	0,004
Kinetina	0,004
Zeatina	0,001
Agar bacteriológico (Duchefa)	8

- Notas:
- El pH del medio se ajusta a 5.7 con KOH y HCl antes de añadir el agente gelificante.
 - Los medios de cultivo se esterilizan en autoclave, a 115°C durante 30 minutos.

Tabla 7. Solución vitamínica SH (Shahin, 1985)

Componente	(mg·L ⁻¹)
Rivoflavina	0,25
Ácido nicotínico	2,5
Tiamina ClH	10
Piridoxina ClH	1
Ácido fólico	0,5
Biotina	0,05
D-Pantotenato cálcico	0,5
Colina ClH	0,1
Glicina	0,5
L-Cisteína	1
Ácido málico	10
Ácido ascórbico	0,5

Nota: - Las vitaminas se preparan en soluciones stock 100X y se almacenan a -20°C.

3.2.3 Determinación del nivel de ploidía en las plantas regeneradas mediante citometría de flujo

Para poder eliminar las plantas que no son diploides se analiza el nivel de ploidía por citometría de flujo de todas las plantas regeneradas. Para ello se lleva a cabo la cuantificación del contenido de ADN nuclear de las células según el método de Smulders y colaboradores (1994). El tejido vegetal (un fragmento de hoja joven de aproximadamente 1 cm²) se trocea finamente con una cuchilla en una placa Petri de 50 mm de diámetro. Se añaden 200µL de tampón de extracción de núcleos (Partec, Münster, Alemania) y 800 µL de una solución que contiene 1 mg·L⁻¹ de fluorocromo DAPI (4,6-diamino-2phenyl-indole) (DAPI staining solution, Partec) cuya función es teñir el ADN. Tras resuspender la mezcla, se filtra a través de una malla de nylon de 50 µm. La suspensión de núcleos se hace circular por el



circuito de microtubos de un analizador de ploidía (Partec PA-II Ploidy Analyser), equipado con una lámpara de mercurio que emite luz ultravioleta de 366 nm. La corriente de núcleos en suspensión pasa por una cámara de cuarzo (conducto de 10 µm que no permite el paso simultáneo de dos unidades), donde es

iluminada por una fuente de luz ultravioleta. Como consecuencia, el fluorocromo DAPI fijado al ADN emite una fluorescencia proporcional a la cantidad de ADN del núcleo, que es reconocida y captada por un fotorreceptor. El sistema informático que lleva incorporado el citómetro convierte cada señal fluorescente en un punto sobre la pantalla que se sitúa en distintas posiciones de acuerdo con su intensidad. El gráfico resultante ordena los datos según el contenido nuclear de ADN en el eje de abscisas y contabiliza el número de núcleos de cada tipo en el eje de ordenadas. El sistema se calibra previamente situando el pico correspondiente a un contenido de ADN igual a 2C (diploide en fase G1) sobre el valor que se desee de la escala de abscisas.

3.2.4 Aclimatación y trasplante

A los 15-20 días del cultivo en medio de enraizamiento, las plantas se encuentran en el estado adecuado para realizar la aclimatación. Tras extraer la planta del bote de vidrio, se eliminan los restos de agar de la raíz, procurando no dañarla. A continuación, se trasplanta a una maceta que contiene fibra de coco estéril y se cubre con un vaso de plástico para evitar la deshidratación.



A los 7-10 días, la planta se puede trasplantar con el cepellón a una maceta que contenga fibra de coco. El vaso de plástico transparente se mantiene durante los primeros 10-15 días de cultivo. Una vez transcurrido este periodo, se elimina el vaso, dándose por concluida la etapa de aclimatación.

3.2.5 Cultivo de plantas de *S. pennellii* en el invernadero y obtención de las descendencias

Las plantas se cultivan en invernaderos con sistema de refrigeración por aire acondicionado e iluminación artificial. Se utiliza fibra de coco como sustrato y macetas de 25 cm de diámetro y 30 cm de altura. Las plantas se cultivaron entutoradas a una o dos guías, eliminándose periódicamente las yemas laterales. Se realiza fertirrigación (Tabla 8) mediante

sistemas de riego por goteo o mediante riego manual, según las necesidades de cada experimento.

Tabla 8. Solución nutritiva

Componente	(g·L ⁻¹)
PO ₄ H ₃	0.147
Ca(NO ₃) ₂	0.820
NO ₃ K	0.202
SO ₄ K ₂	0.348
SO ₄ Mg	0.240
BMX (micronutrientes)	0.100

Algunos autores consideran a *Solanum pennellii* como autoincompatible o parcialmente autoincompatible. En realidad, hay accesiones que exhiben distintos niveles de autoincompatibilidad. A su vez, dentro de una accesión hay genotipos que exhiben distintos grados de autoincompatibilidad. Es lo que ocurre con la accesión PE47, razón por la cual tuvimos serios problemas para obtener progenies de autofecundación a partir de algunas líneas T-DNA. Tras los problemas detectados en la obtención de descendencias se probaron diferentes estrategias para intentar aumentar el número de líneas capaces de producir semillas: cultivo de las plantas en diferentes invernaderos y épocas del año, polinizaciones manuales y tratamientos de nebulización para imitar las condiciones ambientales de su hábitat natural.

En estas condiciones de cultivo es donde se realizaron los experimentos de evaluación de la tolerancia al estrés salino *in vivo* a largo plazo. En este caso se mantenía parte del invernadero con riego hidropónico (plantas testigo) y parte del invernadero con el mismo riego al que se le añadían diferentes concentraciones de NaCl para aplicar el tratamiento estresante.

3.3 Evaluación de la tolerancia a la salinidad

Para llevar a cabo la evaluación de la tolerancia a la salinidad se han realizado diversos experimentos en varios sistemas de cultivo y etapas del desarrollo de las plantas.

3.3.1 Evaluación de la tolerancia al estrés salino *in vitro*



El material vegetal inicial son ápices meristemáticos obtenidos tras el cultivo de yemas axilares en medio de enraizamiento gelificado con agar. Tras 3 semanas de cultivo las yemas axilares brotan hasta alcanzar un tamaño de entre 3 y 4 cm. Los ápices meristemáticos se cortan con un tamaño aproximado de 2 cm de forma que no presenten ninguna raíz. Además, se cortan las hojas expandidas antes de subcultivar los ápices en un medio con diferentes concentraciones de sal.



Evaluación con ápices meristemáticos sin enraizar

Se diseñó un sistema de cultivo que permitiera el crecimiento de los ápices meristemáticos sin el empleo de agentes gelificantes. Para ello, se utilizó como soporte físico canicas de vidrio (16 mm de diámetro) que se colocaban en el fondo del recipiente al que se añadía el medio de enraizamiento. En un primer experimento se evalúan 6 ápices meristemáticos en un bote con 30 mL de medio de enraizamiento (sin agar) + NaCl 100mM. Estos recipientes se mantienen durante 3 semanas en la cámara de cultivo en condiciones de fotoperiodo.

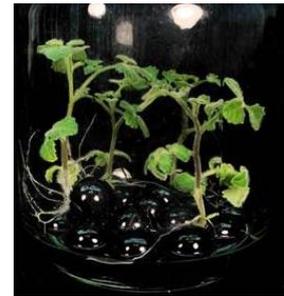


Tras este primer escrutinio, realizado con 491 líneas T-DNA, se realizó un segundo experimento con 53 líneas preseleccionadas por mostrar un fenotipo alterado en el que, además de los explantes en medio salino, se cultivaban los ápices meristemáticos en medio de enraizamiento sin NaCl. Esta comparación directa entre un medio con sal y otro sin sal

sirve para corroborar los resultados observados en el primer experimento y para diferenciar entre mutantes afectados en la tolerancia al estrés salino y mutantes afectados en caracteres del desarrollo (en el caso de estos últimos se observaría un fenotipo alterado incluso en los explantes cultivados sin NaCl).

Evaluación con ápices meristemáticos enraizados

Se diseñó un sistema de cultivo que permitiera el crecimiento de los ápices meristemáticos previamente enraizados sin el empleo de agentes gelificantes. Para ello, se dejaba que los ápices meristemáticos formaran raíces durante tres semanas antes de comenzar con la aplicación del estrés salino.



Como en el apartado anterior, se utilizó como soporte físicos de vidrio que se colocaban en el fondo del recipiente. Antes de empezar el tratamiento salino se retiraba con una pipeta el medio en el que se habían formado las raíces. En un primer experimento se evaluaron 6 ápices meristemáticos enraizados de cada línea T-DNA en un bote con 30 mL de medio de enraizamiento (sin agar) + NaCl 100mM. Estos recipientes se mantenían durante 3 semanas en la cámara de cultivo en condiciones de fotoperiodo.

Tras este primer escrutinio, realizado con 292 líneas T-DNA, se realizó un segundo experimento con 57 líneas preseleccionadas, tanto en estas condiciones como en las anteriores. En este segundo experimento, además de los explantes en medio salino, se cultivaban los ápices meristemáticos en medio de enraizamiento sin NaCl.

3.3.2 Evaluación de la tolerancia al estrés salino *in vivo*

En este caso se evaluaron las distintas líneas T-DNA en diferentes momentos de su desarrollo tras la aclimatación de los ápices meristemáticos.

Evaluación a corto plazo: sistema hidropónico pasivo

Este sistema se basa en el transporte pasivo de la solución nutritiva desde un contenedor hasta la maceta donde crece la planta. Este diseño permite un suministro continuo y adaptado al consumo, lo cual puede mejorar la homogeneidad de las condiciones del cultivo que se consigue por otros sistemas de cultivo. Como depósito para los 200 mL de solución nutritiva se utilizó un bote de vidrio esterilizado. La maceta rellena de fibra de coco estéril se colocó sobre el bote. La conexión entre la maceta y el recipiente se consiguió con una tira de bayeta (15 cm x 1,5 cm) insertada por los agujeros del fondo de la maceta.



Para reducir la evaporación y el crecimiento de contaminantes, se tapan el bote y la maceta con papel de aluminio al que se le hace un agujero para introducir el ápice meristemático enraizado.

El material inicial para estos ensayos se obtuvo a partir de yemas axilares cultivadas durante 3-4 semanas en un medio de enraizamiento. Estas plantas se introducían en las macetas con cuidado de no dañar las raíces y se regaron con 20 mL de solución nutritiva ($\frac{1}{2}$ de macronutrientes MS). Con objeto de facilitar la aclimatación, durante las primeras dos semanas de cultivo las plantas se cubrieron con un vaso transparente.



Tras ese periodo se quitaron los vasos, se añaden 30 mL de solución nutritiva y se mantiene el cultivo una semana más. A partir de ese momento comenzó la evaluación de la tolerancia al estrés salino regando la maceta con solución nutritiva + NaCl 200 mM (sin NaCl en el caso de las plantas testigo) y rellenando los depósitos con esta misma solución hasta el final del experimento.



La puesta a punto de este nuevo sistema de evaluación de la tolerancia a la salinidad nos permitió utilizarlo en la evaluación de diversas líneas preseleccionadas de tomate. En este caso la diferencia con el sistema descrito para *S. pennellii* es que se parte de semilla. Para ello se hace un tratamiento de pregerminación (ver apartado 3.2.3) antes de pasarlas a la maceta y no se aplica el estrés salino hasta que las plantas no han desarrollado una hoja expandida (10-12 días)

Evaluación a medio plazo

Los experimentos de evaluación a medio plazo se llevan a cabo en macetas de 13x13x13 cm. Tras realizar la aclimatación y el transplante, cuando las plantas alcanzan los 25-30 cm de altura (Día 0), se inicia el tratamiento salino mediante la adición de NaCl 150 mM a la solución nutritiva (ver Tabla 8).



3.4 Evaluación de la expresión del gen delator

En genotipos seleccionados se ha llevado a cabo el análisis histoquímico X-GLUC para detectar la expresión del gen delator (*uidA*). Tras recoger las muestras, se les añadía solución X-GLUC en cantidad suficiente para que las cubriera. Estas muestras se dejaron durante 24 horas incubando en oscuridad, a 37°C para que tuviera lugar la reacción histoquímica.

Tabla 9. Solución X-GLUC

Componente	Concentración
X-GLUC (Disolver en DMSO 1%)	1.0 mM
Tampón Na₂HPO₄	100 mM
Tampón NaH₂PO₄	100 mM
EDTA	10 mM
K-Ferricyanide (FeII)	0.5 mM
K-Ferricyanide (FeI)	0.5 mM
Triton X-100	0.1%
Agua destilada	Hasta completar volumen deseado

Tras la incubación, se eliminó la solución X-GLUC y se realizan varios lavados con etanol 70% para eliminar la clorofila de los tejidos y poder detectar mejor la tinción azul que produce la expresión del gen *uidA*. Las fotografías de estas muestras se tomaron con la ayuda de una lupa (MZFLIII; Leica).

3.5 Técnicas de microscopía

En algunos mutantes se han realizado diversos estudios histológicos. Para analizar los cortes histológicos se ha empleado un microscopio óptico (Nikon Eclipse E600) con cámara digital refrigerada DS-Ri. La preparación de las muestras se ha realizado mediante los siguientes métodos.

3.5.1 Fijación de las muestras e inclusión en parafina

Pequeñas secciones de tejido vegetal se introducen en el fijador FAE y se somete a vacío durante 5 minutos.

Tabla 10. Fijador FAE

Componente	Concentración
Etanol absoluto	50%
Formaldehido 37%	10%
Ácido acético glacial	5%

Posteriormente se cambia el fijador utilizado por fijador fresco y se mantienen las muestras de 4 a 16 horas a 4°C. Transcurrido este tiempo se elimina el fijador y se van haciendo cambios cada media hora a soluciones de etanol con concentraciones crecientes (50%, 70%, 85%, 95% y 100%). Después se pasan las muestras por concentraciones crecientes de Histoclear en etanol absoluto (33%, 50%, 67% y 100%). Tras esto, se pasan las muestras por concentraciones crecientes de Parafina en Histoclear (33%, 50%, 67% y 100%) manteniendo una temperatura de 58°C. Una vez las muestras quedan incluidas en Parafina ya se pueden montar los bloques donde el tejido podrá ser cortado con un micrótopo para obtener las secciones correspondientes y montarlas sobre portaobjetos con Polysina.

Eliminación de la parafina

Para eliminar la parafina de los cortes se sumergen los portaobjetos en:

- Histoclear 10'
- EtOH 100% 10'
- EtOH 90% 5'
- EtOH 70% 5'
- H₂O 10'

3.5.2 Tinción con azul de anilina

Una vez eliminada la parafina (ver apartado anterior), se cubren las muestras con tampón fosfato (0,07 mM Na₂HPO₄·2H₂O pH=9) durante 30 minutos. Se elimina el tampón y se añade azul de anilina al 0,05% (disuelta en tampón fosfato). Tras 15 minutos de incubación ya se puede montar la muestra y visualizarla en el microscopio. La calosa se ve teñida de azul.

3.5.3 Tinción con floroglucinol

Se puede realizar en cortes hechos a mano. Para ello simplemente es necesario añadir una gota de floroglucinol (se obtiene disolviendo 0,1 g de floroglucinol en 100 mL de EtOH 95% + 16 mL de HCl conc.) encima del tejido e incubar durante 30-60 minutos. Las paredes lignificadas se tiñen de rojo.

3.6 Caracterización genética del fenotipo mutante

Mediante el análisis del fenotipo de las plantas transformadas (TG1) y las segregaciones observadas en sus descendencias (plantas TG2 obtenidas mediante autofecundación de las TG1 o plantas procedentes de retrocruces) podemos saber qué tipo de mutación se ha producido. Así, por ejemplo, si se ha comprobado que la planta TG1 es WT (WT = wild type, fenotipo silvestre) y la segregación en TG2 se ajusta a $\frac{3}{4}$ WT : $\frac{1}{4}$ M nos encontramos ante una mutación monogénica recesiva. Con este tipo de análisis se pueden identificar fenómenos

como la dominancia o recesividad de la mutación, la influencia de la mutación en la viabilidad de las plantas mutantes o en la viabilidad gamética.

El ajuste de los datos observados a los datos esperados para cada una de las segregaciones posibles se realiza mediante el Test χ^2 aceptando que el modelo es adecuado cuando la probabilidad de fallo es menor del 5%.

En el caso de realizar varios experimentos donde se analiza la segregación fenotípica se lleva a cabo el Test χ^2 de contingencia para asegurarnos de que se pueden unir todos esos datos y tratarlos como si estuvieran obtenidos en un único experimento.

3.7 Determinación del número de insertos T-DNA

Para saber si en una planta hay algún inserto de T-DNA se puede analizar si esa planta es resistente a la kanamicina (detectaremos todas aquellas plantas que portan al menos un inserto *nptII* funcional) o analizarla molecularmente para ver si porta un inserto de T-DNA (aunque éste no confiera resistencia a la kanamicina) e incluso algún fragmento tanto del T-DNA como del cuerpo del vector.

3.7.1 Estimación del número de insertos mediante técnicas de cultivo *in vitro*

Para estimar el número de insertos T-DNA con el gen *nptII* funcional se pueden utilizar diferentes ensayos de crecimiento en kanamicina. Se pueden cultivar yemas axilares en medio de enraizamiento, semillas en medio de germinación o explantes de cotiledón u hoja en medio organogénico, todos ellos con kanamicina ($100 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$). Así, por ejemplo, en el caso de que haya un único inserto *nptII* funcional, la TG2 se ajustará a 3 KanR : 1 KanS; mientras que si hay dos insertos *nptII* funcionales, la TG2 se ajustará a 15 KanR : 1 KanS.

El ajuste de los datos observados a los datos esperados para cada una de las segregaciones posibles se realiza mediante el Test χ^2 aceptando que el modelo es adecuado cuando la probabilidad de fallo es menor del 5%.

En el caso de realizar varios experimentos donde se analiza la segregación fenotípica se lleva a cabo el Test χ^2 de contingencia para asegurarnos de que se pueden unir todos esos datos y tratarlos como si estuvieran obtenidos en un único experimento.

3.7.2 Determinación del número de insertos T-DNA mediante análisis moleculares

En todas las técnicas de análisis molecular presentadas en esta Tesis hemos contado con la colaboración del laboratorio de la Universidad de Almería dirigido por el Dr. Rafael Lozano. A continuación se pasan a describir los protocolos utilizados.

Extracción de ADN genómico

A partir de 15-30 g de hojas frescas, previamente ultracongeladas, se realizó la extracción y purificación del ADN genómico siguiendo el protocolo descrito por Dellaporta y colaboradores (1983).

Determinación del número de insertos T-DNA mediante hibridación Southern

Para detectar el número de insertos T-DNA en cada línea mutagenizada, en primer lugar se realizó una digestión enzimática del ADN genómico previamente aislado y purificado, utilizando para ello las enzimas de restricción *EcoRI* (Takara) y *HindIII* (Takara). Se utilizaron entre 10-20 μg de ADN genómico para cada digestión, realizada en un volumen final de 150 μL que contenía 15 μL del Buffer 10X correspondiente a cada enzima, 60 U de cada una de las dos enzimas elegidas, 1 μL de una solución de ARNasa ($10 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$), 4 μL de espermidina y el volumen necesario de agua destilada estéril hasta completar el volumen final. Las reacciones se incubaron 8 h a 37°C con *EcoRI* y *HindIII*. Posteriormente, las digestiones se precipitaron mediante la adición de 1/10 del volumen de Acetato de sodio 3 M pH 5,2 y a continuación 2 volúmenes de etanol absoluto. Después de centrifugar y lavar el pellet, el ADN se resuspendió en 20 μL de TE 0,1 N (10 mM Tris HCl 1 M pH 8, 0,1 mM EDTA 0,5 M pH 8).

El Southern Blot se realizó mediante transferencia alcalina a una membrana de nylon cargada positivamente (Hybond-N+, Amersham Biosciences), la cual adhiere al ADN fuertemente, ya que el ADN es una molécula con carga negativa. Así, el ADN digerido y

precipitado se analizó en un gel de agarosa al 0,8 %. La electroforesis se realizó a 60 V durante 14 h. Posteriormente, dicho gel fue sometido a una serie de tratamientos: i) depurinización con una solución de HCl 0,125 M, y ii) desnaturalización con una solución de NaCl y NaOH (87,66 g NaCl y 20 g NaOH al 99 % de riqueza en 1 l). Una vez desnaturalizado el gel, se llevó a cabo la transferencia capilar durante un periodo de 8-14 h. Para ello, sobre una bandeja se colocó el portageles del revés, y encima de éste el gel. A continuación se puso la membrana de nylon (Hybond-N+, Amersham Biosciences), 2 papeles Whatman®, y sobre estos se colocó una torre de papel junto con un cristal o soporte para una pesa de 400 g. La torre de papel ejerce una fuerza de capilaridad, haciendo subir el Buffer de Transferencia (88,23 g Citrato sódico, 175,32 g NaCl en un litro a pH 7-8) desde la bandeja y arrastrando consigo el ADN del gel hasta quedar atrapado fuertemente en la membrana.

El último paso metodológico es la hibridación con una sonda marcada radiactivamente con P^{32} . En nuestro caso usamos una sonda quimérica del gen *nptII* fusionado a un fragmento de un gen endógeno como es *FALSIFLORA (FA)*, lo que permite tener un control positivo de la hibridación. En un primer paso se puso la membrana a pre-hibridar a 65°C durante 5 minutos en el horno de hibridación, en agitación y con el buffer comercial, Perfecthyb™ Plus (Sigma Aldrich, Inc.), el cual permite aumentar la señal de hibridación. Durante la pre-hibridación se llevó a cabo el marcaje radioactivo de la sonda. Para ello, se desnaturalizó la sonda por calor, calentando una solución de la misma durante 5 minutos en agua hirviendo. A continuación se colocó en hielo para evitar que el ADN se re-naturalice. A este ADN se le añadieron 50µCi de P^{32} (dCTP) y una alícuota del kit Rediprime II Random Prime Labelling System (GE Healthcare), que contiene la DNA polimerasa, el tampón y el resto de reactivos necesarios para la síntesis de la sonda radiactiva. La incubación tuvo lugar a 37°C durante 10 minutos. Después, el producto de la reacción se hizo pasar por una columna (illustra™ MicroSpin Columns, GE Healthcare) para eliminar el exceso de radioactividad, así como polimerasa, cebadores aleatorios, dejando solo pasar a la sonda marcada con radioactividad. Por último, dicha sonda se desnaturalizó durante 5 minutos en agua hirviendo y, finalmente, se añadió al tubo de hibridación. La incubación tuvo lugar a 65°C durante 8-10 h. Tras la hibridación se procedió a realizar el lavado de la membrana con la solución SSPE (0,2M buffer fosfato, pH aprox. 7,4, contiene 2,98M NaCl y 0,02M de EDTA) en orden decreciente de concentración, 3 lavados de SSPE 5X, 3 lavados de SSPE 2,5X, 3 de 1X y 1 lavado de 0,1X.

De este modo se aumenta la astringencia, para eliminar la radioactividad inespecífica pegada a la membrana. La membrana lavada fue plastificada e introducida en un casete junto con una película auto-radiográfica, donde se dejó una semana exponiendo para su posterior revelado.

3.8 Determinación de la cosegregación entre inserto T-DNA y fenotipo mutante

La determinación de si existe cosegregación entre el inserto de T-DNA (sea completo o parcial) y el fenotipo mutante es un aspecto clave en el estudio de estas líneas. Cuando se comprueba que existe cosegregación, el siguiente paso es la clonación del gen que causa el fenotipo mutante mediante técnicas de Anchor-PCR. Esto es posible gracias a que en esos casos el gen alterado ha quedado etiquetado por el inserto de T-DNA. Sin embargo, cuando no existe cosegregación hay que recurrir a otras estrategias de clonación más costosas en tiempo y esfuerzo.

3.8.1 Estimación de la cosegregación mediante técnicas de cultivo *in vitro*

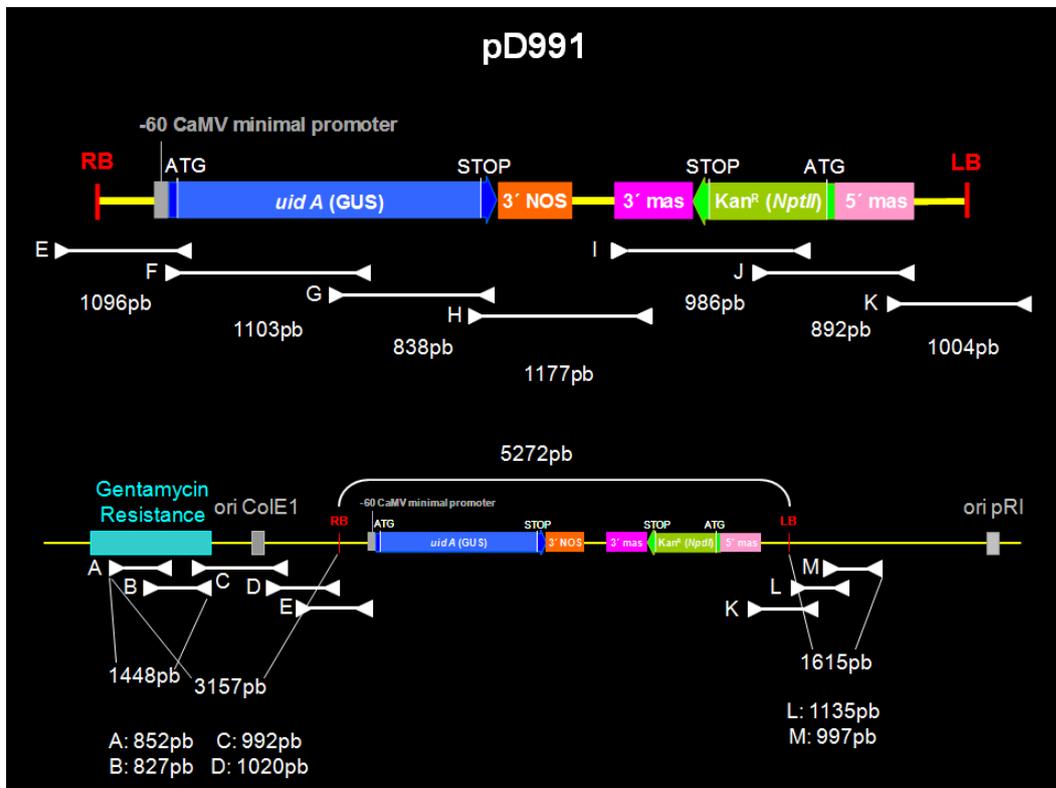
Mediante estas técnicas se puede establecer la cosegregación entre la presencia de un inserto T-DNA con *nptII* funcional y el fenotipo mutante. Para ello hay que comparar las segregaciones respecto de su fenotipo y de la resistencia a la kanamicina en plantas de poblaciones segregantes (TG2 y TG3 habitualmente). En estos casos se modeliza la segregación esperada tanto para el caso de cosegregación como de ausencia de cosegregación. Por ejemplo, en un mutante recesivo, si se encuentra una planta sensible a kanamicina (KanS) y de fenotipo mutante (M) se puede establecer que no existe cosegregación entre un inserto de T-DNA y el fenotipo mutante.

El ajuste de los datos observados a los datos esperados para cada una de las segregaciones posibles se realiza mediante el Test χ^2 aceptando que el modelo es adecuado cuando la probabilidad de fallo es menor del 5%.

En el caso de realizar varios experimentos donde se analiza la segregación fenotípica se lleva a cabo el Test χ^2 de homogeneidad para asegurarnos de que se pueden unir todos esos datos y tratarlos como si estuvieran obtenidos en un único experimento.

3.8.2 Determinación de la cosegregación mediante PCR

Mientras que la evaluación de la resistencia a la kanamicina mediante cultivo *in vitro* (ver apartado 3.7.1) sólo podemos analizar si hay algún inserto T-DNA con el gen *nptII* funcional, mediante un diseño adecuado de los cebadores de PCR se puede saber si en una planta se encuentra el T-DNA completo, algún fragmento de ese T-DNA o, incluso, algún fragmento del cuerpo del vector. Para este fin se diseñaron en el laboratorio del Dr. Lozano diferentes parejas de cebadores del inserto T-DNA junto con diferentes regiones del cuerpo del vector pD991.



Las condiciones de la PCR utilizadas fueron: desnaturalización inicial de 5 min - 94°C, seguido de 35 ciclos de 30 seg a 94°C, 30 seg a 60°C y 1 min - 72°C, terminando con una extensión final de 5 min - 72°C. Las reacciones de PCR fueron analizadas por electroforesis en gel de agarosa, teñidas con BrEt al 1% y visualizadas con luz UV.

3.9 Clonación del gen etiquetado mediante Anchor-PCR

Para clonar las secuencias flanqueantes al T-DNA se utilizó la estrategia Anchor-PCR (Schupp *et al.*, 1999), con la que se puede determinar las secuencias flanqueantes a ambos extremos del T-DNA (Gidoni *et al.*, 2003). En esta estrategia se realizan digestiones del DNA con endonucleasas de restricción. A los fragmentos generados se ligan adaptadores sintéticos, de tal manera que podemos realizar una serie de PCRs "anidadas" o "solapantes" usando parejas de cebadores, uno del T-DNA (Right Border) y otro del adaptador sintético con saltos de tamaño conocidos, lo que facilita la identificación de los fragmentos específicos en un gel de agarosa.



En primer lugar se digirió 500 ng del ADN genómico de cada planta a analizar durante 4h a 37°C con una serie de enzimas de restricción, a saber, *EcoRV*, *DraI*, *Scal*, *StuI*, *AluI*, *HincII*, *PvuII* y *SmaI*, en una reacción de 40 µL de volumen final. Se seleccionaron estas enzimas porque generan fragmentos de extremos romos, los cuales fueron ligados al adaptador. El adaptador es una doble cadena parcial de ADN, descrita su preparación en Schupp y col. (1999). El adaptador (5 pmol) fue ligado durante 3h a 37°C al ADN genómico previamente digerido con una unidad de T4 DNA ligasa (Promega). La digestión-ligación del ADN fue utilizada como molde en la amplificación inicial. En esta PCR primaria se usó 1 µL de digestión-ligación, 1 unidad de *REDTaq*[®] DNA polimerasa (SIGMA-Aldrich) y 0,33 µM de los cebadores RB-1 (5'-ACAGTTTTTCGCGATCCAGAC-3') y Ad-1 (5'-CTAATACGACTCACTATAGGC-3')

que anillan en el Right Border y en el Adaptador respectivamente. El programa utilizado en el termociclador (Eppendorf *Mastercycler ep gradient S*) comenzó con una desnaturalización de 4 min - 94°C, seguido por 35 ciclos de 30 s - 94°C, 30 s - 55°C y 2 min - 72°C y por último, una extensión final de 1 min - 72°C. El producto de PCR fue diluido 50 veces y re-amplificado en la PCR secundaria. Para esta segunda PCR se usaron dos cebadores internos, a saber, RB-2 (5'-GGTCTTGCGAAGGATAGTGG) y Ad-2 (5'-CTATAGGGCTCGAGCGGC-3'). Las condiciones de PCR fueron las mismas que en la primaria, solo cambió la temperatura de anillamiento a 58°C. El método Anchor-PCR descrito por Schupp y col. (1999), ha sido mejorado añadiendo una PCR terciaria, con el objeto de incrementar la especificidad de los fragmentos amplificados. Para esta tercera PCR se diluyó 100 veces el producto de amplificación de la PCR secundaria, el cual fue utilizado como molde y amplificado con los cebadores RB-3 (5'-CTGGCGTAATAGCGAAGAGG-3') y Ad-3 (5'-AGCGGCGGGGAGGT-3'). Las condiciones de PCR utilizadas fueron: desnaturalización inicial de 2 min - 94°C, seguido de 35 ciclos de 15 s - 94°C, 15 s - 60°C y 2 min - 72°C, terminando con una extensión final de 1 min - 72°C.

Un décimo del volumen de la reacción fue analizado por electroforesis en gel de agarosa y teñido con BrEt al 1%. El producto de la reacciones de PCR de interés fueron purificados mediante cromatografía de afinidad utilizando el kit GenElute™ PCR Kit (Sigma-Aldrich) y fueron reamplificados con el cebador Ad-3 y RB-3 en reacciones independientes de secuenciación utilizado los reactivos *BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit* (Applied Biosystems). Las secuencias obtenidas fueron analizadas y comparadas con las secuencias depositadas en la base de datos SGN (Solanacea Genomics Networks - <http://www.sgn.cornell.edu/tools/blast/>), para conocer tanto la identidad de la región secuenciada, como la posición del T-DNA en el genoma de la planta.

Una vez conocida las secuencias flanqueantes al inserto T-DNA en el mutante en estudio tras el clonaje por Anchor-PCR es posible comprobar en las progenies segregantes si el inserto (alelo mutante) se encuentra en homocigosis, heterocigosis, o acigosis en cada una de las plantas que constituye la población segregante en estudio. El diagnóstico genotípico se realizó mediante PCR, en concreto, mediante dos reacciones de amplificación. En una PCR se utilizan los cebadores específicos del alelo silvestre y en la otra PCR se usa uno de los cebadores del gen y otro cebador del T-DNA. Ambas PCR se usan para cada planta de la familia segregante, de modo que, las plantas que amplifiquen sólo el alelo silvestre serán catalogadas como acigóticas, en las que amplifiquen sólo el alelo mutante serán

homocigóticas para el T-DNA y aquellas plantas donde amplifiquen ambas PCRs serán hemicingóticas. De esta manera se puede correlacionar la homocigosis, hemicingosis y acigosis para el alelo mutante con el fenotipo mutante y así confirmar si la mutación responsable del fenotipo detectado está etiquetada por el inserto o no.

4 Resultados

4.1 Generación de líneas T-DNA de *Solanum pennellii*

En nuestro grupo se ha desarrollado un método eficaz para la obtención de plantas transgénicas de distintas accesiones de *S. pennellii* (Atarés *et al.*, 2001). En este trabajo se ha conseguido la generación de líneas T-DNA mediante cocultivo de explantes de hoja con la cepa LBA 4404 de *Agrobacterium tumefaciens*. Para ello se ha utilizado el vector pD991 gentilmente cedido por el Dr. Thomas Jack (Department of Biological Sciences; Dartmouth College, USA) que funciona como una trampa de intensificadores (ver apartado 3.2.7).

En cualquier programa de mutagénesis insercional es clave obtener una cantidad considerable de plantas transgénicas para detectar el mayor número posible de mutantes e identificar los genes alterados en dichos mutantes. Por tanto, es imprescindible disponer de un método de transformación altamente eficaz. En trabajos previos del grupo se había transformado la accesión 20164, obteniendo eficacias del 6.1% (Gisbert *et al.*, 1999). Esta eficacia de transformación (número de líneas T-DNA diploides/número de explantes inoculados) es adecuada para, por ejemplo, llevar a cabo el análisis funcional de un gen candidato, pero es insuficiente para abordar un programa de mutagénesis insercional. Debido a ello, realizamos una serie de experimentos para aumentar la eficacia del método de transformación. En concreto, se cambió el medio organogénico, se eliminó la fase de precultivo y de elongación de ápices meristemáticos, se mejoró el proceso de inoculación y se introdujo la timentina como antibiótico para controlar el crecimiento de *Agrobacterium tumefaciens* (Atarés *et al.*, 2011). Con estos cambios metodológicos, se logró aumentar la eficacia de transformación hasta el 135 % en la accesión 20164 y el 102 % en la accesión PE47. Estos resultados nos han permitido obtener 2181 líneas T-DNA diploides de *Solanum pennellii* con una trampa de intensificadores (Tabla 11).

Tabla 11: Eficacias de transformación con la trampa de intensificadores en dos accesiones de *S. pennellii*

Accesión de <i>S. pennellii</i>	Explantes inoculados	Nº de plantas transgénicas	Nº de plantas transgénicas diploides	Eficacia de transformación (%)
20164	816	1363	1105	135
PE47	1056	1223	1076	102
Total	1872	2586	2181	117

Tras la obtención de las plantas transgénicas (TG1), se clonaron para mantener algunas copias en condiciones axénicas durante el periodo de evaluación. El resto de réplicas clonales se utilizaban para las evaluaciones *in vitro* e *in vivo* y para obtener la siguiente generación (TG2) mediante autofecundación de las plantas TG1 (Fig. 1).



Figura 1.- Mantenimiento de las plantas transgénicas. a) Recipientes con plantas en la cámara de cultivo. b) Crecimiento en el invernadero tras su aclimatación.

Con las líneas T-DNA obtenidas se han realizado distintos experimentos con el fin de detectar mutantes para los caracteres de interés. En concreto, se ha empleado la colección de plantas TG1 para la detección de mutantes dominantes, semidominantes y aditivos. Sin embargo, las dificultades encontradas para la obtención de descendencias ha limitado mucho la posibilidad de trabajar con progenies TG2 a fin de detectar mutantes recesivos. Como se ha comentado en el apartado de Material y Métodos, *S. pennellii* es una especie catalogada como autoincompatible, aunque hay algunas accesiones o ecotipos autocompatibles (Bedinger *et al.*, 2011). Teniendo en cuenta los problemas que plantea el trabajo con ciertas accesiones de esta especie, hemos cultivado las plantas en diferentes

invernaderos y épocas del año, se han hecho polinizaciones manuales y se han llevado a cabo tratamientos de nebulización que trataban de imitar las condiciones ambientales de su hábitat natural para intentar conseguir el máximo número de progenies posible. Pese al gran esfuerzo realizado, no se han obtenido más de cuarenta descendencias TG2 con suficientes semillas. Estas líneas son las que hemos utilizado para la detección de mutantes recesivos.

4.2 Detección de mutantes hipersensibles a estrés salino

Tras realizar diversas evaluaciones en cultivares de tomate y accesiones de especies silvestres relacionadas, se observó que las que presentaban mayor nivel de tolerancia al estrés salino eran las accesiones 20164 y PE47 de *S. pennellii* (Bolarín *et al.*, 1991; Cano *et al.*, 1996; Rus *et al.*, 1999; Santa-Cruz *et al.*, 1999). Por este motivo, se eligieron estas accesiones como material de partida para obtener una colección de líneas T-DNA. El principal interés de esta colección es que ofrece la posibilidad de encontrar mutantes afectados en su nivel de tolerancia a la salinidad que pueden servir como punto de partida para identificar algún gen clave para dicho carácter. Con esta estrategia, aunque no se puede descartar la aparición de un mutante con mayor tolerancia que el material de partida, lo esperable es detectar mutantes hipersensibles por efecto de alguna inserción del T-DNA u otra alteración genética (p.ej. un cambio de tipo somaclonal).

Tras la obtención de un número suficiente de líneas T-DNA diploides de *Solanum pennellii* se empezó con el escrutinio de mutantes. Para ello, se aclimataron plantas TG1 y se cultivaron sin y con estrés salino en dos invernaderos diferentes (Valencia y Murcia). Se evaluaron 566 líneas T-DNA en invernadero a medio y largo plazo. Detectamos algunos mutantes del desarrollo, pero en estos experimentos iniciales no encontramos ninguna línea con un fenotipo mutante que estuviera directamente relacionado con alteraciones en la tolerancia a la salinidad. Además, pese al enorme esfuerzo para conseguir progenies (ver el apartado anterior), sólo se consiguieron semillas TG2 en 78 líneas T-DNA y, de éstas, sólo conseguimos más de 100 semillas TG2 en 40 líneas. Tras este resultado, centramos nuestros esfuerzos en la detección de mutantes dominantes en plantas TG1.

El manejo de este material, además de no permitir la detección de mutaciones recesivas, presenta otros inconvenientes. En primer lugar, para la detección fiable de los fenotipos alterados hay que emplear plantas con un desarrollo inicial uniforme, lo cual, tras las fases de clonación y aclimatación, puede ser difícil de conseguir. Además, el número de plantas por línea T-DNA evaluada no podía ser excesivo, debido a la gran cantidad de líneas que había que cribar y las limitaciones de recursos (principalmente, espacio en el invernadero o en las cámaras de cultivo *in vitro*).

Así pues, decidimos desarrollar diversas metodologías (*in vitro* e *in vivo*) para cribar la colección de líneas T-DNA en condiciones de estrés salino en diferentes momentos del desarrollo. El empleo de estos métodos de evaluación permitió detectar mutantes alterados en diversos procesos que pueden estar relacionados con las diferentes componentes del estrés salino (p.ej. componente osmótica, en una primera etapa, y componente iónica, a más a largo plazo). Además, la utilización de estos métodos nos proporcionó una herramienta para caracterizar de forma más detallada los procesos alterados en un mutante concreto cuando se vio sometido a estrés (por ejemplo, la formación de raíces adventicias, el desarrollo radicular, el desarrollo reproductivo, etc).

A continuación se exponen los resultados más relevantes tras el escrutinio de 887 líneas T-DNA de la accesión PE47 en el que se analizaron casi 8000 plantas de *S. pennellii* para detectar mutantes hipersensibles a la salinidad mediante diferentes métodos.

4.3 Evaluación de la tolerancia al estrés salino *in vitro*

Para llevar a cabo estos experimentos elegimos como explante de partida el ápice meristemático de plantas axénicas de *S. pennellii*, es decir, la parte terminal del tallo que incluye el meristemo apical y un pequeño segmento de unos 2 cm. Este material nos permitió evaluar el efecto del NaCl en el desarrollo, tanto de la parte aérea como de la raíz. Se hicieron dos tipos de experimentos: en el primero se colocaban los ápices meristemáticos sin enraizar en contacto con el agente selectivo; en el segundo, se añadía el medio con NaCl cuando el ápice meristemático ya había desarrollado raíces en un medio sin presión de selección. Para llevar a cabo estos experimentos optamos por un medio de cultivo líquido (p.ej. no solidificado con agar), ya que de esta forma podíamos cambiar el medio de cultivo

sin alterar los explantes o las plantas (p.ej. en lugar de un subcultivo del material vegetal, lo que hacíamos era sustituir o cambiar el medio de cultivo). Lo que pretendíamos con estos dos experimentos era ver cómo afecta la presencia de estrés salino tanto a la formación de nuevas raíces como al posterior desarrollo de éstas.

4.3.1 Evaluación con ápices meristemáticos sin enraizar

Tal y como se ha comentado antes, el primer método para evaluar la tolerancia a la salinidad de las líneas TG1 de *S. pennellii* fue el cultivo de ápices meristemáticos no enraizados en medio líquido con NaCl. Antes de proceder al cribado de las líneas T-DNA, se cultivaron explantes de plantas testigo de la accesión PE47 a distintas concentraciones (0, 100, 150, 200 mM) de NaCl (Fig. 2).

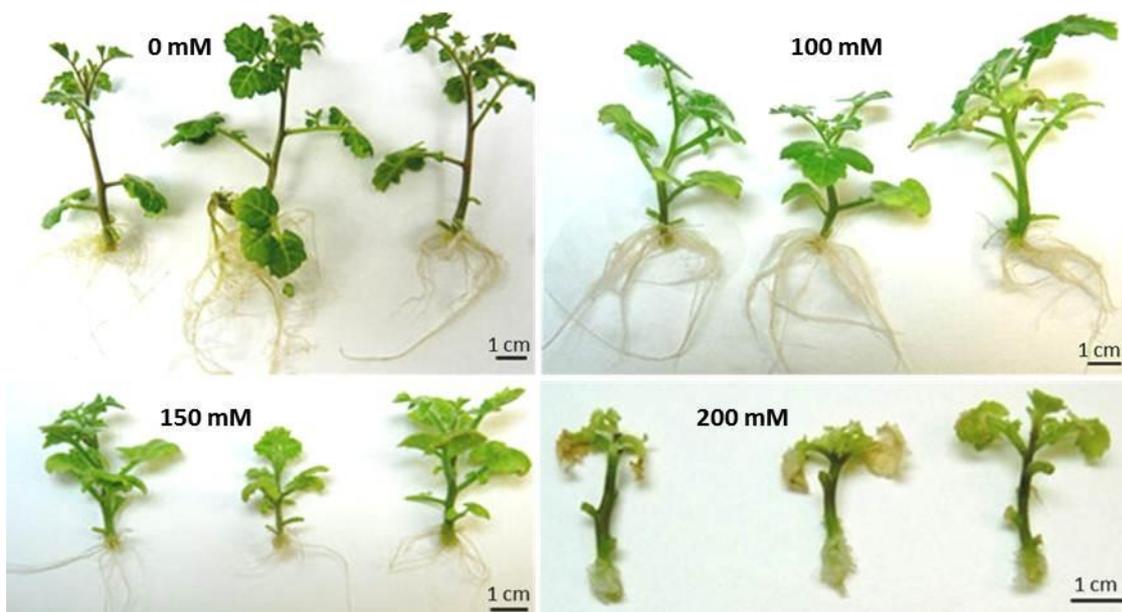


Figura 2.- Respuesta de ápices meristemáticos de *S. pennellii* PE47, que inicialmente no estaban enraizados, al cultivo en medios líquido con diferentes concentraciones de NaCl durante 3 semanas.

Los ápices meristemáticos cultivados sin NaCl tenían un desarrollo normal tanto de la parte aérea como del sistema radicular. Los explantes cultivados con 200 mM de NaCl no desarrollaron raíces, presentaron la formación de un callo desorganizado en la base del explante, una inhibición casi total del crecimiento de la parte aérea y síntomas de clorosis y necrosis en las hojas. Los explantes cultivados con 150 mM de NaCl enraizaron con dificultad

y presentaron un menor crecimiento de la parte aérea así como clorosis en las hojas. Las plantas que se desarrollaron a partir de los ápices cultivados en medio con 100 mM de NaCl mostraron una ligera reducción de tamaño y leves síntomas de clorosis en las hojas basales, pero el sistema radicular se desarrolló con total normalidad. Los leves síntomas de afección por el estrés aplicado con NaCl 100 mM nos parecieron los más adecuados para llevar a cabo la identificación de mutantes hipersensibles a la salinidad entre las líneas T-DNA de *S. pennellii*.

Detección de mutantes mediante el cultivo de ápices meristemáticos sin enraizar

Tras un primer cribado, en el que se evaluaron 491 líneas transgénicas independientes (seis explantes de cada línea), se detectaron 53 líneas que mostraron alteraciones de diferentes caracteres después de tres semanas de cultivo en un medio de enraizamiento suplementado con NaCl 100 mM. Algunas de estas líneas presentaron una reducción del tamaño de las plantas y/o clorosis y necrosis en las hojas. También se observaron alteraciones en el desarrollo de las raíces en varios genotipos (Fig. 3).

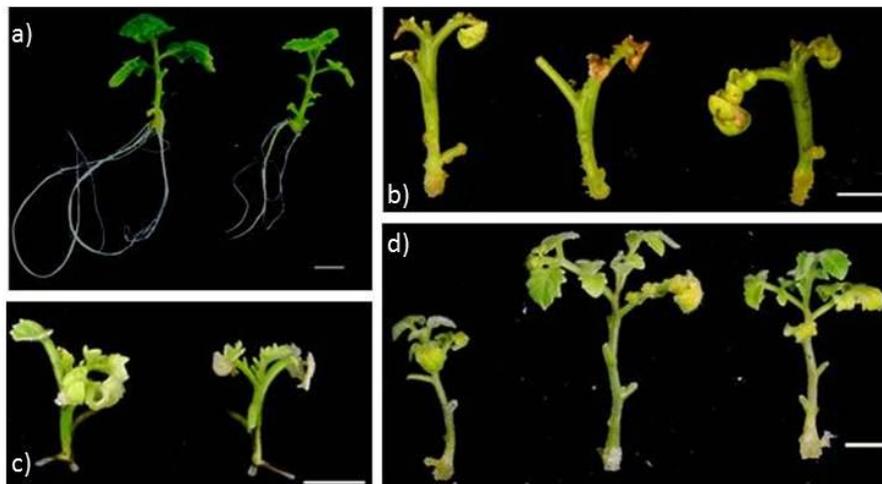


Figura 3.- Líneas ETSP con fenotipo silvestre o con diferentes alteraciones tras el cultivo de ápices meristemáticos no enraizados en medio líquido con 100 mM de NaCl durante 3 semanas. Fenotipo silvestre (a); línea con síntomas de necrosis (b); línea con síntomas de clorosis (c) y línea con ausencia de enraizamiento (d). La barra representa 1 cm.

Corroboración del fenotipo en las líneas preseleccionadas mediante el cultivo de ápices meristemáticos sin enraizar

Para corroborar los resultados del primer cribado se cultivaron de nuevo los genotipos preseleccionados en las mismas condiciones, además de en condiciones control, es decir, sin añadir NaCl al medio de enraizamiento. De las 53 líneas evaluadas, 34 no volvieron a presentar los síntomas inicialmente observados u otras diferencias notables en comparación con el testigo PE47 expuesto a las mismas condiciones. En diez genotipos las alteraciones observadas en este ensayo no correspondieron con el fenotipo exhibido anteriormente, lo cual refuerza la necesidad de realizar estas comprobaciones y la dificultad de trabajar con plantas TG1. Por otra parte, nueve genotipos dieron resultados similares a los observados en el experimento anterior, es decir, presentaron un fenotipo consistente con lo visto previamente. Entre estas líneas, algunas presentaron un fenotipo de hipersensibilidad al tratamiento estresante y otras diversas alteraciones del desarrollo. En este caso, incluso los ápices meristemáticos cultivados sin estrés salino, tenían un crecimiento anómalo (Fig. 4).



Figura 4.- Plantas PE47 y línea ETSP hipersensible tras el cultivo de ápices meristemáticos no enraizados en medio líquido con 0 mM de NaCl (parte superior de cada imagen) y 100 mM de NaCl (parte inferior de cada imagen). Comparación entre respuesta de PE47 exhibiendo la formación de raíces (a) y línea hipersensible a la salinidad sin desarrollo radicular en presencia de NaCl (b). La barra representa 1 cm.

4.3.2 Evaluación con ápices meristemáticos enraizados

Como alternativa al sistema anterior, diseñamos un experimento en el que, en primer lugar, se permitió el enraizamiento de los ápices meristemáticos en un medio sin presión de selección y, a continuación, con el explante ya enraizado, se aplicó la presión de selección.

De esta forma, lo que esperábamos era detectar mutantes afectados, no en la emergencia de raíces adventicias, sino en el crecimiento y desarrollo radicular en medios salinos.

Con el fin de ver la adecuación de este método, lo primero que hicimos fue estudiar el comportamiento de las plantas testigo en diferentes concentraciones de NaCl, a fin de elegir la más adecuada para el cribado. Los ápices meristemáticos del testigo (PE47) se cultivaron de forma individual durante tres semanas en un medio líquido IAA 0,1 mg·L⁻¹. Después de este periodo, el medio líquido fue sustituido por otro con los mismos componentes a los que se les añadía diferentes concentraciones de NaCl para continuar el cultivo durante otras tres semanas (Fig. 5).



Figura 5.- Ápices meristemáticos de *S. pennellii* PE47 enraizados durante 21 días en medio líquido sin NaCl y subcultivados durante 21 días en el mismo medio líquido sin NaCl (izquierda), con NaCl 100 mM (centro) y NaCl 200 mM (derecha). La barra representa 1 cm.

En el medio con NaCl 100 mM se observó una notable reducción del tamaño de la parte aérea, así como un engrosamiento del tallo y la presencia de hojas cloróticas. En cambio, en el medio con NaCl 200 mM, aparte del menor crecimiento y la clorosis foliar, las raíces tenían un menor desarrollo. Por tanto, en este caso, seleccionamos una concentración de NaCl 200 mM como la más adecuada para llevar a cabo la detección de los mutantes.

Detección de mutantes mediante cultivo de ápices meristemáticos enraizados

Se evaluaron 292 líneas transgénicas independientes (8 explantes de cada línea) en este sistema de cultivo. En 17 de ellas se observaron alteraciones notables. Seis líneas exhibían una detención del crecimiento aéreo y radicular. Cuatro líneas mostraron una reducción de crecimiento; entre ellas, destacó una por su clorosis y ausencia de engrosamiento de tallo en condiciones salinas. Esta ausencia de engrosamiento del tallo pudo observarse en dos líneas más y en otras tres se observó la formación de pequeñas inflorescencias. Por último, otras dos líneas presentaron fenotipos alterados, una con graves síntomas de hiperhidratación, y otra con un crecimiento similar en medios con y sin NaCl y más vigorosa que el testigo PE47 en condiciones salinas (Fig. 6).

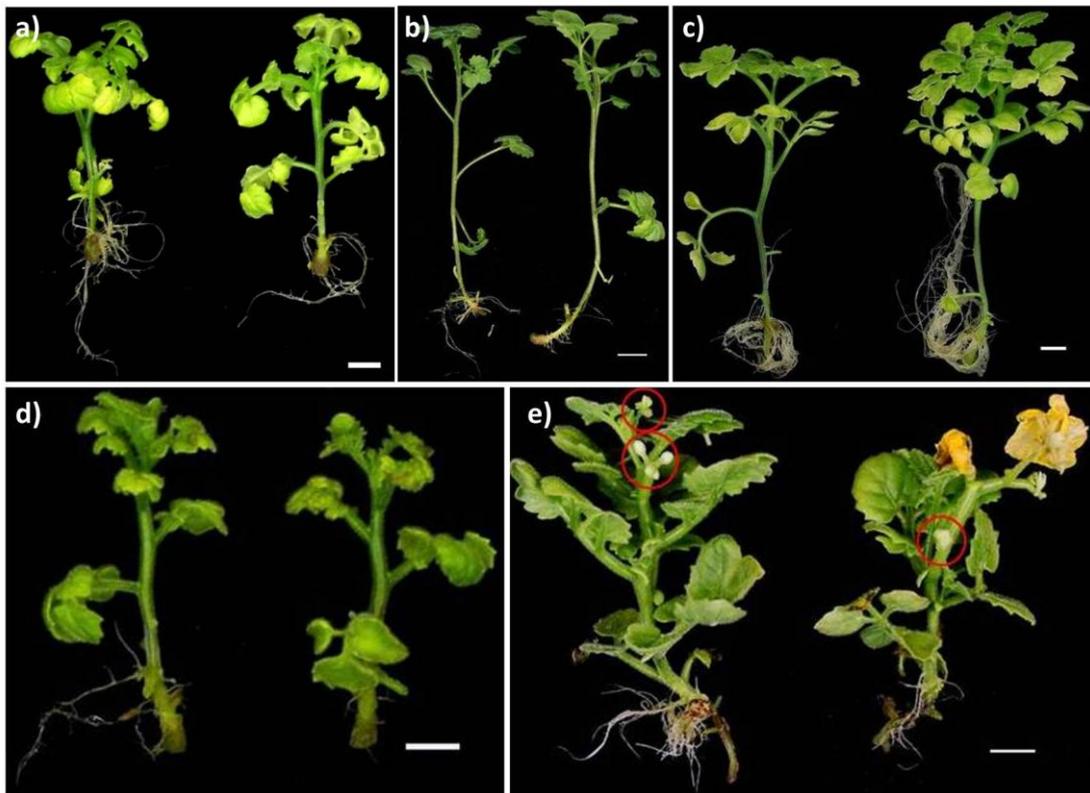


Figura 6.- Plantas obtenidas tras el cultivo de ápices meristemáticos previamente enraizados en medio líquido con 200 mM de NaCl. a) Testigo PE47; líneas ETSP b) sin el engrosamiento típico del tallo; c) con un crecimiento más vigoroso que el testigo en condiciones salinas; d) con un crecimiento reducido y e) con floración *in vitro*. La barra representa 1 cm.

Corroboración del fenotipo en las líneas preseleccionadas mediante el cultivo de ápices meristemáticos enraizados

Para corroborar los resultados obtenidos en los experimentos anteriores se realizó un nuevo experimento en el que se cultivaron ápices meristemáticos enraizados en el medio selectivo a partir de genotipos preseleccionados en los anteriores ensayos. De cada una de las 57 líneas evaluadas se cultivaron 5 réplicas clonales en condiciones salinas (NaCl 200 mM) y otras 5 en el mismo medio sin sal. Para permitir un mejor desarrollo y facilitar las observaciones, se cultivó cada planta en un recipiente.

Entre las líneas preseleccionadas, 14 presentaron un fenotipo similar al anteriormente detectado. La presencia de clorosis en las hojas, acompañada en algunos casos por un engrosamiento del tallo, fue una de las alteraciones más frecuentes. También se observaron algunas plantas con síntomas de hiperhidratación. Aunque esta alteración puede aparecer con cierta frecuencia entre las plantas cultivadas *in vitro*, no es frecuente en el caso de *S. pennellii*. Aún así, sólo se seleccionaron las líneas que presentaron estos síntomas de forma consistente en varios experimentos, ya que podrían estar afectadas en algún mecanismo de absorción o transporte de agua. Por último, se pudo corroborar el fenotipo de algunos mutantes que exhibían distintas alteraciones, como ausencia de enraizamiento, crecimiento reducido de la parte aérea, floración temprana y mayor número de tricomas.

Tras realizar todos estos experimentos se seleccionaron algunos mutantes con cambios en diversos caracteres relacionados con la tolerancia al estrés. A continuación se presenta la caracterización inicial de los dos mutantes más interesantes identificados mediante esta estrategia de evaluación *in vitro*.

4.3.3 Caracterización del mutante 4165 ETSP

La línea 4165 ETSP fue seleccionada en el primer escrutinio por las alteraciones en la parte aérea. El fenotipo se observó en condiciones control, pero, tras el tratamiento salino los síntomas fueron mucho más acentuados. Los niveles de clorosis no fueron excesivos, pero las plantas exhibían hiperhidratación, lo que se manifestaba por el aspecto casi transparente de sus hojas, así como por la fragilidad de los tallos (Fig. 7).

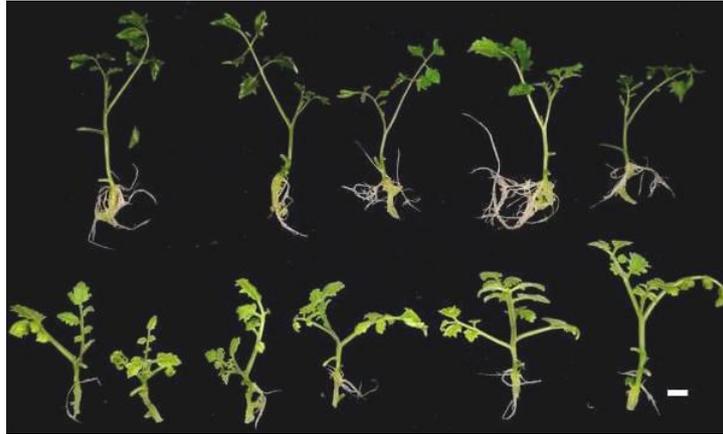


Figura 7.- Crecimiento de ápices meristemáticos previamente no enraizados de la línea 4165 ETSP cultivados durante tres semanas en medios de enraizamiento sin NaCl (arriba) y con 100 mM de NaCl (abajo). La barra representa 1 cm.

Las observaciones con plántulas enraizadas antes de la aplicación del estrés salino fueron parecidas. En ambos medios, sin y con sal, las plantas mostraron una buena capacidad de crecimiento. Además, debido a la duración prolongada del tratamiento, los síntomas anteriormente descritos fueron más pronunciados. En concreto, en el medio sin sal los síntomas de hiperhidratación se acentuaron, desarrollándose hojas deformadas y con aspecto cristalino. Además, en estas condiciones se observó también la aparición de múltiples raíces adventicias en el tallo. Por otra parte, en condiciones salinas las plantas tuvieron un crecimiento ligeramente reducido y mostraron una clorosis pronunciada en las hojas (Fig. 8).

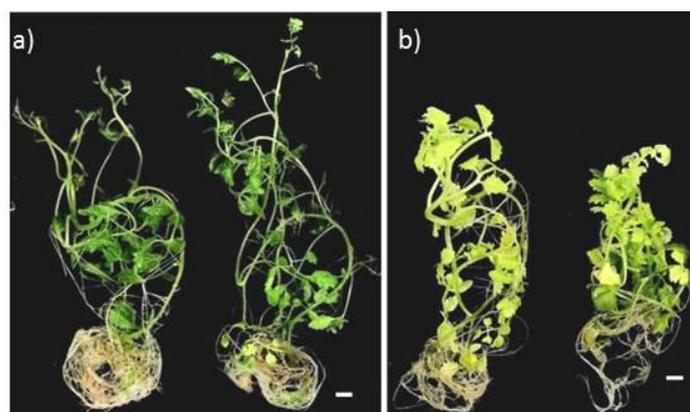


Figura 8.- Crecimiento de ápices meristemáticos previamente enraizados de la línea 4165 ETSP y cultivados durante tres semanas en diferentes medios. a) Desarrollo de hiperhidratación en un medio suplementado con 0 mM de NaCl. b) Plantas con síntomas de clorosis en un medio suplementado con 200 mM de NaCl. La barra representa 1 cm.

Por los resultados de estos experimentos, se puede concluir que la línea 4165 ETSP mostró en cultivo *in vitro* una menor tolerancia frente al estrés salino que la accesión PE47. Estos resultados tendrán que ser corroborados en posteriores experimentos.

4.3.4 Caracterización del mutante 515 ETSP

Mientras que en un medio sin NaCl los ápices meristemáticos sin raíces de la línea 515 ETSP mostraron un desarrollo normal y fueron capaces de enraizar, los ápices meristemáticos cultivados en condiciones salinas exhibieron una clorosis pronunciada y necrosis en los bordes de los folíolos. El crecimiento de las raíces adventicias también se vio afectado. Si bien se producía la emergencia de raíces adventicias en la base del explante, su longitud no superaba los 2-3 mm de longitud (Fig. 9).



Figura 9.- Crecimiento de ápices meristemáticos no enraizados previamente de la línea 515 ETSP cultivados durante tres semanas en medios de enraizamiento con 0 mM de NaCl (arriba) y 100 mM de NaCl (abajo). La barra representa 1 cm.

Estas observaciones se confirmaron con explantes enraizados antes de aplicar el estrés salino. Al cultivar los ápices meristemáticos enraizados en el medio sin sal el desarrollo fue idéntico al de las plantas silvestres. Sin embargo, en condiciones salinas tanto la parte aérea como la radicular tuvieron un crecimiento muy reducido, alcanzando un tamaño equivalente a la mitad de lo que crece un testigo en esas mismas condiciones. Por tanto, la sal ocasiona un fuerte efecto, manifestándose además en el diámetro del tallo, donde se produce un engrosamiento destacable desde el inicio del tratamiento (Fig. 10).

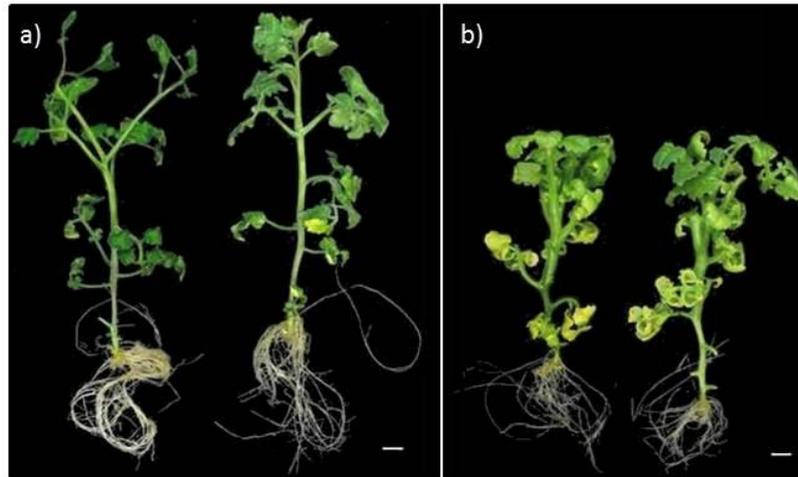


Figura 10.- Crecimiento de ápices meristemáticos previamente enraizados de la línea 515 ETSP cultivados durante tres semanas en distintos medios. a) Desarrollo normal en un medio con 0 mM de NaCl. b) Plantas con un tamaño reducido y un elevado diámetro del tallo en un medio con 200 mM de NaCl. La barra representa 1 cm.

En definitiva, en los experimentos realizados hasta el momento se ha visto que la línea 515 ETSP presenta síntomas de sensibilidad al estrés salino mientras que en condiciones normales no se ha detectado ninguna alteración.

4.4 Evaluación de la tolerancia al estrés salino *in vivo*: sistema hidropónico pasivo

Cuando se pretende realizar un escrutinio *in vivo* para la detección de mutantes alterados en el nivel de tolerancia a estrés salino, lo habitual es realizar el ensayo en un invernadero. Este método, aunque fiable, no está exento de problemas. En primer lugar, si lo que se persigue es llevar a cabo un escrutinio de un elevado número de líneas T-DNA a medio o largo plazo, se precisa una gran superficie de invernadero. Al problema que supone la disponibilidad de espacio hay que sumarle el tiempo requerido. En efecto, la evaluación a medio plazo de un cultivar de tomate, o de una accesión de una especie silvestre relacionada, requiere un periodo de 1,5 a 2 meses, mientras que si se trata de una evaluación a largo plazo el periodo se extiende a 4-6 meses. Obviamente, el número de evaluaciones por año es limitado, y no solo por el periodo requerido para cada evaluación, sino porque no todas las épocas del año son adecuadas a la hora de llevar a cabo una evaluación en invernadero, es decir, no es lo mismo hacer una evaluación en el periodo otoño-invierno que en el de primavera-verano.

Además, cuando lo que se pretende es evaluar plantas TG1 (que es lo que necesitábamos hacer en el caso de las líneas T-DNA de *S. pennellii*) hay un problema adicional: para que la evaluación sea fiable hay que obtener un número suficiente de réplicas clonales, lo que supone un esfuerzo adicional.

En teoría, algunos de los problemas mencionados, excepto el que se refiere a la superficie requerida, se pueden solventar utilizando un invernadero como el que disponemos en el IBMCP, ya que, a diferencia de los invernaderos habituales, éste dispone de un sistema que permite controlar las variables ambientales, al menos hasta cierto punto. De hecho, en este invernadero podemos hacer evaluaciones de tomate, así como de otras especies hortícolas, a lo largo de prácticamente todo el año. Sin embargo, en el caso de algunas accesiones de especies silvestres relacionadas con el tomate hay que interpretar con cuidado los resultados de una evaluación o, al menos, conviene tener en cuenta las peculiaridades del material vegetal. Por ejemplo, las accesiones que nosotros utilizamos de *S. cheesmaniae* o de *S. galapagense* no se adaptan bien al entutorado habitual en cultivares indeterminados de tomate. Cuando se cultivan estas accesiones lo mejor es dejar que las plantas crezcan libremente (de forma similar a lo que suele hacerse con un cultivar de tomate de tipo determinado en el campo), pero esto supone una superficie excesiva. Alternativamente, las plantas de las accesiones de *S. pennellii* o *S. pimpinellifolium* se adaptan razonablemente bien al entutorado tradicional en tomate, pero cuando se cultivan en el invernadero antes mencionado no se desarrollan como lo hacen en otros no tan sofisticados, sino de tipo más convencional. No estamos seguros de cuál es la causa, pero pensamos que puede deberse a la menor irradiación UV. El invernadero en cuestión no es de tipo tradicional, sino que tiene una doble estructura, es decir, es como si fuera un invernadero dentro de otro. Desde luego tiene la ventaja de que cumple con creces la estricta normativa sobre el cultivo de plantas transgénicas, pero el doble techo de plástico reduce la iluminación y filtra en exceso la radiación UV. Esto no representa ningún problema para el cultivo del tomate, pero puede que sí lo sea para algunas especies silvestres. En concreto, el hábitat natural de algunas accesiones de *S. pennellii* o de *S. pimpinellifolium* (p.ej. desierto de Atacama) se caracteriza por unas condiciones extremas, no solo de alta temperatura, déficit hídrico en el suelo y baja humedad (excepto a las primeras horas del día, por las nieblas matinales), sino también por el exceso de radiación UV. Según opinan algunos expertos (Dr. Rafael Fernández Muñoz, comunicación personal), algunos ecotipos de estas especies no solo están adaptados al

exceso de radiación UV, sino que precisan de un nivel suficiente de radiación para que su desarrollo sea óptimo. En apoyo de esta opinión, hemos comprobado que las plantas de una accesión de *S. pimpinellifolium* se desarrollan y fructifican perfectamente en un invernadero de la Universidad de Almería, pero no en otro en el que se añadió una cubierta que filtra la radiación UV para el control de ciertas plagas (Dr. Rafael Lozano, comunicación personal). En definitiva, esta puede ser la causa de que las plantas de *S. pennellii* no se desarrollen perfectamente en invernaderos de doble techo, como el nuestro, o en aquellos otros en los que la cubierta filtre en exceso la radiación UV.

4.4.1 Evaluación a corto plazo de la colección de líneas T-DNA de *S. pennellii* mediante un sistema hidropónico pasivo

Por las razones anteriormente expuestas, intentamos desarrollar un método de escrutinio que combinara las ventajas de una evaluación *in vitro* (p.ej. ambiente controlado, homogeneidad, rapidez, etc.) con las de una evaluación *in vivo* (p.ej. cultivo de las plantas en un ambiente, o en unas condiciones, más próximas a la situación real). En caso de lograrlo, tendríamos un sistema fiable que, además, permitiría realizar el escrutinio de un gran número de plantas.

Tras varias pruebas, se diseñó un sistema de cultivo en el que se colocaba un bote de vidrio con el medio líquido y, encajado sobre él, la maceta con el sustrato y la planta aclimatada. Ambos recipientes se conectaban mediante unas tiras de bayeta que permitían que el medio líquido, con o sin sal, llegara a la maceta de forma que la planta se pudiera nutrir. Se partía de material esterilizado (medio líquido, bote de vidrio, sustrato,...) y el conjunto se cubría con papel de aluminio para disminuir el crecimiento de microorganismos. Como en los casos anteriores, inicialmente se evaluaron los efectos de concentraciones crecientes de NaCl en plantas silvestres de la accesión PE47 de *S. pennellii* (Fig. 11).



Figura 11.- Comparación de plantas de *S. pennellii* PE47 en el sistema de capilaridad tras 14 días a concentraciones de 0, 100, 200, 300 y 400 mM de NaCl (respectivamente de izquierda a derecha). La barra representa 1 cm.

En las plantas cultivadas con 100 mM de NaCl se observó un efecto positivo de la sal respecto del crecimiento vegetativo de los testigos a 0 mM, es decir, las plantas sometidas al tratamiento salino desarrollaron más biomasa que las cultivadas sin ningún NaCl. Por otro lado, concentraciones a partir de 300 mM NaCl afectaban demasiado al crecimiento de las plantas y redujeron el desarrollo hasta un nivel que podría dificultar la identificación de posibles mutantes. En base a estos resultados se decidió utilizar una concentración de NaCl 200 mM, ya que en estas condiciones solo se observó una ligera reducción del tamaño de las plantas respecto del tratamiento control.

Para estudiar la adecuación de este sistema, se evaluaron 152 líneas T-DNA de la colección de *S. pennellii*. Elegimos 104 que no habían sido previamente evaluadas y se cultivaron 6 réplicas clonales de cada línea con 200 mM de NaCl, a fin de ver si detectábamos algún fenotipo interesante. Además, se evaluaron otras 48 líneas que habían mostrado algún resultado interesante en los experimentos previos de evaluación *in vitro*. En este caso se cultivaron 6 plantas en condiciones salinas y 6 en condiciones control.

Gracias a esta nueva metodología se ha podido comprobar que en diez líneas T-DNA seleccionadas en los experimentos previos (identificación de mutantes *in vitro*) se corroboraba el fenotipo observado. Además, se ha podido mejorar la caracterización fenotípica de estos mutantes gracias a la observación de las plantas crecidas en estas condiciones. Por otro lado, se han detectados nuevos mutantes con alteraciones en la respuesta *in vivo* que no mostraban ninguna diferencia con el testigo en los experimentos de cultivo *in vitro* y otros dos mutantes entre las líneas evaluadas por primera vez. A continuación se presentan las líneas que mostraron unos resultados más interesantes.

4.4.1.1 Caracterización del mutante 4268 ETSP

El mutante 4268 ETSP se detectó en el experimento de cultivo de ápices meristemáticos sin enraizar en medio salino. En estas condiciones se observaron síntomas de clorosis y necrosis en las hojas de las plantas cultivadas a 100 mM NaCl. También se vio que el enraizamiento adventicio estaba afectado, ya que sólo uno de los explantes evaluados fue capaz de formar raíces rudimentarias. Este resultado se corroboró en el siguiente ensayo, en el cual se compararon el crecimiento de explantes sin enraizar en medios con 0 y 100 mM NaCl. Se observó que la reducción del tamaño de la planta fue consistente con los resultados obtenidos anteriormente. En el cultivo en maceta se presentó de nuevo la notable reducción del crecimiento como característica principal del mutante 4268 ETSP, resultando en plantas que no llegaron a alcanzar la mitad de tamaño de los testigos (Fig. 12).



Figura 12.- Comparación de dos plantas testigo (izquierda) con dos plantas de la línea 4268 ETSP (derecha). a) Plantas WT procedentes del cultivo de ápices meristemáticos sin enraizar previamente con un desarrollo normal a 100 mM de NaCl y plantas mutantes sin desarrollo radicular, un menor tamaño y síntomas de clorosis y necrosis. b) Plantas WT exhiben en el sistema hidropónico con 200 mM de NaCl con un fenotipo normal y plantas de la línea 4268 ETSP con un menor tamaño. La barra representa 1 cm.

En resumen, los resultados de varios experimentos indican que la línea 4268 ETSP es un mutante dominante que presenta problemas de enraizamiento, así como una reducción de tamaño en presencia de estrés salino tanto *in vitro* como *in vivo*.

4.4.1.2 Caracterización del mutante 4388 ETSP

Esta línea se preseleccionó porque en la evaluación de ápices meristemáticos sin enraizar las hojas de los explantes cultivados con sal presentaban cierta clorosis, mientras que los cultivados en condiciones control no tenían estos síntomas. Además, se observó que algunas yemas axilares de los explantes comenzaron a brotar. Tras la evaluación de los ápices meristemáticos enraizados se pudo comprobar que las plantas sometidas a estrés presentaron el mismo tipo de clorosis que los explantes de los experimentos anteriores.

Tras cultivar la línea 4388 ETSP en el sistema hidropónico, además de corroborar el fenotipo de clorosis anteriormente visto en los ensayos *in vitro*, se observó que las plantas cultivadas en macetas con tratamiento salino (NaCl 200 mM) mostraron una reducción considerable de tamaño en comparación con los testigos cultivados sin sal (Fig. 13).

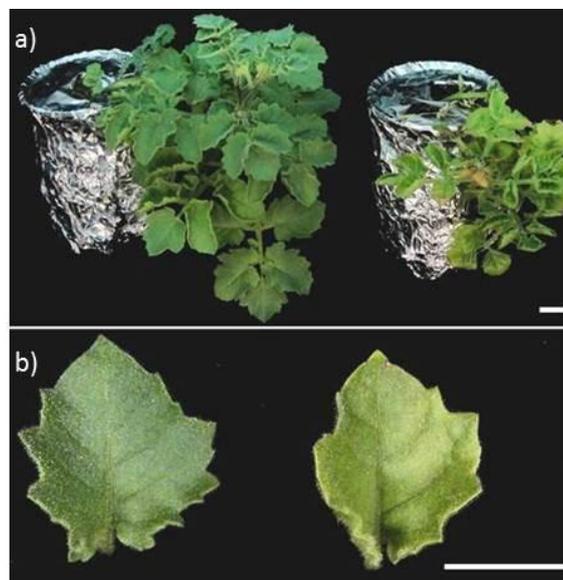


Figura 13.- Plantas de la línea 4388 ETSP tras 40 días de cultivo en el sistema hidropónico. a) Comparación de plantas cultivadas con 0 mM (izquierda) y 200 mM (derecha) de NaCl. b) Comparación de hojas de ambas plantas con síntomas de clorosis en presencia de NaCl (derecha). La barra representa 1 cm.

En resumen, los resultados obtenidos indican que es un mutante dominante que presenta un fenotipo de clorosis tanto *in vitro* como *in vivo*, siempre que es sometido a condiciones de estrés salino. Lo más interesante es que el fenotipo aparece en condiciones de estrés salino, pero no cuando las plantas se cultivan en ausencia de NaCl. Esto indica que no se trata de un mutante del desarrollo, sino que está afectado en un gen que interviene en algunos de los mecanismos que confieren la tolerancia a estrés salino en la accesión PE47 de *S. pennellii*.

4.4.1.3 Caracterización del mutante 5442 ETSP

La detección de este mutante se realizó en el ensayo de cultivo de ápices meristemáticos enraizados con tratamiento salino. La alteración más significativa fue la floración de estos ápices meristemáticos *in vitro* tras seis semanas de cultivo, las tres últimas con 200 mM de NaCl. No se observó ninguna otra alteración (p.ej. menor tamaño, clorosis, falta de turgencia,...) que pudiera relacionarse con hipersensibilidad al estrés salino.

El fenotipo de floración temprana se pudo corroborar en el ensayo con el sistema hidropónico. En estas condiciones, las inflorescencias aparecieron en tan solo 5 semanas de cultivo y las flores alcanzaron el estadio de antesis (Fig. 14).



Figura 14.- Comparación de una planta testigo (izquierda) con la línea 5442 ETSP (derecha) tras 35 días de cultivo en sistema hidropónico con 200 mM de NaCl. La barra representa 1 cm.

En resumen, este mutante es muy interesante por su respuesta de floración temprana cuando la planta se ve sometida a un tratamiento estresante.

4.4.1.4 Caracterización del mutante 5509 ETSP

Al cultivar diversas réplicas clonales de la línea 5509 ETSP en ausencia de NaCl se pudo ver que las plantas mostraban el mismo fenotipo que las plantas WT (accesión PE47). En cambio, cuando se realizó un tratamiento con 200 mM de NaCl se observó que las plantas de la línea 5509 ETSP exhibían una notable reducción en el crecimiento (Fig. 15).

En experimentos paralelos a los descritos en este apartado intentamos adaptar este sistema a la evaluación de la tolerancia a estrés hídrico. Para ello, lo que se hacía era interrumpir el riego de forma que las plantas sufrieran un déficit hídrico. En concreto, se evaluaron 24 líneas (6 réplicas clonales por línea) en las que no se apreció ningún fenotipo reseñable. En cambio, al cultivar réplicas clonales de la línea 5509 ETSP en condiciones de estrés hídrico, se observó una notable acumulación de antocianinas en el envés de la hoja, lo cual suele asociarse a un síntoma de sensibilidad.



Figura 15.- Plantas de la línea 5509 ETSP cultivadas en el sistema hidropónico. a) Comparación de dos plantas 5509 ETSP cultivadas en el sistema hidropónico con 0 mM de NaCl (izquierda) con dos plantas cultivadas con 200 mM de NaCl (derecha). b) Detalle de la coloración del envés de las hojas sometidas a tratamiento de estrés hídrico. La barra representa 1 cm.

En conjunto, los resultados sugieren que la línea 5509 ETSP es sensible tanto a la salinidad como al estrés hídrico.

Así mismo, los resultados indican que este sistema, diseñado para evaluar tolerancia a la salinidad, podría servir también para evaluar tolerancia al estrés hídrico.

4.4.2 Evaluación a corto plazo mediante un sistema hidropónico pasivo de la colección de líneas T-DNA de tomate

A partir de los buenos resultados obtenidos en la evaluación de líneas T-DNA de *S. pennellii* mediante este sistema de cultivo, se decidió adaptar esta misma metodología a la evaluación de líneas de tomate. En este caso, no se partía de ápices meristemáticos enraizados sino de plántulas procedentes de semilla, por lo que era necesario realizar los experimentos adecuados para ajustar el procedimiento a las características del material vegetal.

Para ello, se evaluaron las plantas testigo (P73 y Money Maker) en diferentes concentraciones salinas. Además, se evaluó el mutante hipersensible a la sal 698 ETMM como prueba de concepto, ya que esta línea está perfectamente caracterizada y puede servir para validar la utilidad de este sistema a la hora de evaluar la tolerancia a la salinidad en otras líneas de tomate. Por último, una vez puesta a punto la metodología, se evaluaron diferentes líneas preseleccionadas de tomate que habían presentado alguna alteración pero que no estaban suficientemente caracterizadas.

4.4.2.1 Evaluación de los testigos (Money Maker y P73)

Al igual que en los ensayos anteriores, la primera fase consistió en la evaluación de los testigos, en este caso los cultivares comerciales de tomate Money Maker y P73 con distintas concentraciones de estrés salino (Fig. 16).



Figura 16.- Evaluación del desarrollo de plantas procedentes de semilla de dos variedades de tomate en presencia de NaCl. Plantas de Money Maker (a) y P73 (b) tras 20 días en el sistema hidropónico con 0, 100, 150 y 200 mM de NaCl (de izquierda a derecha) con un aumento progresivo de síntomas. La barra representa 1 cm.

El aumento del contenido de NaCl en la solución nutritiva causó una reducción gradual del tamaño de la planta, así como el oscurecimiento en el color verde de las hojas lo que suele considerarse como un síntoma de sensibilidad al estrés salino. El tratamiento de 200 mM de NaCl produjo una disminución en el crecimiento de las plantas y síntomas de clorosis en las hojas, pero no ocasionó la muerte de las plantas. Por este motivo decidimos seleccionar esta concentración de NaCl para los ensayos con las líneas T-DNA de tomate.

Además, para comprobar que este sistema era válido para la detección de plantas con un nivel de tolerancia al estrés salino alterado, se evaluó el mutante 698 ETMM, un mutante hipersensible de tomate caracterizado previamente en nuestro laboratorio.

4.4.2.2 Evaluación del mutante 698 ETMM mediante el sistema de cultivo hidropónico pasivo

El mutante 698 ETMM fue seleccionado en nuestro grupo por mostrar síntomas de hipersensibilidad al estrés salino. En ausencia de estrés, esta línea se comporta como una planta testigo; sin embargo, cuando se cultiva en presencia de NaCl, exhibe una respuesta hipersensible, que se manifiesta principalmente por una clorosis pronunciada y alteraciones en el desarrollo de diversos órganos, como cotiledones, tallo y hojas.

En la prueba de concepto para evaluar el sistema hidropónico se utilizaron semillas de una línea TG3 homocigótica para el alelo mutante (698-28 ETMM) y una TG3 homocigótica para el alelo WT (698-9 ETMM). A todos los efectos, las plantas de la primera línea se comportan como el mutante 698 ETMM, mientras que las de la segunda son equivalentes a las plantas WT. Las plantas de ambas líneas fueron cultivadas en tres concentraciones de NaCl (0, 100 y 200 mM) para observar su comportamiento. Como era de esperar, las plantas de ambas líneas se desarrollaron normalmente en condiciones control (p.ej. en ausencia de tratamiento salino). Tal y como sucede con las plantas del cultivar original (Money Maker), las plantas homocigóticas para el alelo WT no mostraban ninguna alteración a corto plazo en condiciones de estrés salino. En cambio, las plantas de la línea homocigótica para el alelo mutante cultivadas en medios con 100 o 200 mM de NaCl mostraban las primeras alteraciones a muy corto plazo. En efecto, a los 4 días de incubación las hojas de estas plantas exhibían síntomas de clorosis, más extremos si cabe con el tratamiento de 200 mM de NaCl. Los resultados indicaron que este sistema de evaluación permite detectar una respuesta de hipersensibilidad a la sal a muy corto plazo (Fig. 17).

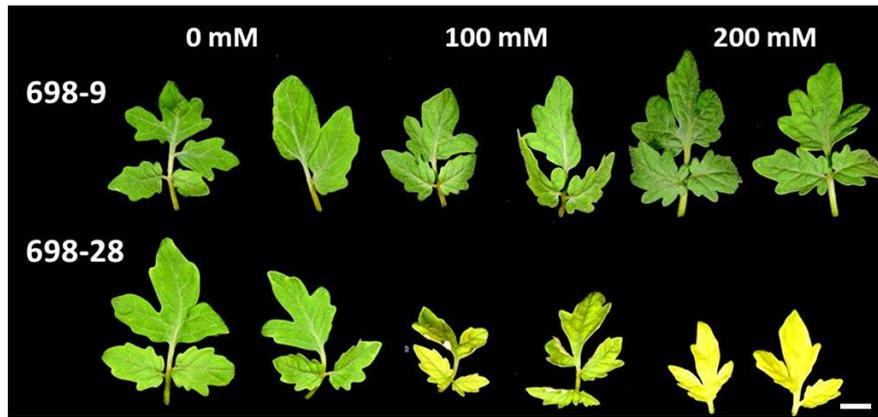


Figura 17.- Evaluación del desarrollo de las hojas de plantas mutantes de la línea 698 ETMM (TG3 homocigótica para el alelo mutante 698-28 ETMM) y plantas hermanas de fenotipo WT (TG3 homocigótica para el alelo WT 698-9 ETMM) tras 4 días en el sistema hidropónico con diferentes concentraciones de NaCl. La barra representa 1 cm.

El cultivo se mantuvo durante 35 días para permitir que las plantas crecieran más tiempo. Aparte de la clorosis, la presencia de NaCl causó el engrosamiento del tallo, un menor crecimiento de la planta, una reducción de la superficie foliar y un marchitamiento adelantado de las hojas más antiguas (Fig. 18).



Figura 18.- Evaluación del desarrollo de diferentes descendencias de la línea 698 ETMM en presencia de 0, 100 y 200 mM de NaCl (de izquierda a derecha) en el sistema hidropónico tras 35 días de cultivo. a) TG3 homocigótica para el alelo WT (698-9 ETMM) con un desarrollo normal. b) Plantas hermanas TG3 homocigótica para el alelo mutante (698-28 ETMM) con fenotipo mutante en presencia de NaCl. La barra representa 1 cm.

Con este experimento se pudo comprobar que el sistema de cultivo hidropónico permitía detectar plantas con un marcado fenotipo de hipersensibilidad a la sal, tanto a corto plazo (4 días) como a medio plazo (35 días), con el ahorro de tiempo y espacio que esto conlleva cuando se compara con los métodos de evaluación tradicionales en invernadero. Además, al realizar las evaluaciones en una cámara de cultivo se podían controlar de una forma más precisa las variables ambientales. Por este motivo decidimos utilizar este sistema para caracterizar mutantes preseleccionados de tomate identificados en nuestro grupo.

4.4.2.3 Evaluación de líneas T-DNA de tomate preseleccionadas

Después de las pruebas iniciales se evaluaron las descendencias de 68 líneas de tomate para estudiar el efecto del estrés salino en su desarrollo mediante el sistema de cultivo hidropónico. Para ello, se cultivaron más de mil quinientas plantas transgénicas de Money Maker (11 líneas segregantes TG2 y 27 líneas TG3 homocigóticas para la mutación) y P73 (15 líneas segregantes TG2 y 15 líneas TG3 homocigóticas para la mutación) transformadas con la trampa de intensificadores. A continuación se presentan los resultados de la línea que dio los resultados más interesantes.

4.4.2.4 901 ET73

El mutante 901 ET73 fue detectado por primera vez en una evaluación de su descendencia TG2 *in vivo* en condiciones control. Esta línea se caracterizó por un menor tamaño en comparación con el WT y una curvatura de las hojas hacia arriba y abajo, síntomas que presentaron 6 de las 12 plantas evaluadas (Fig. 19).

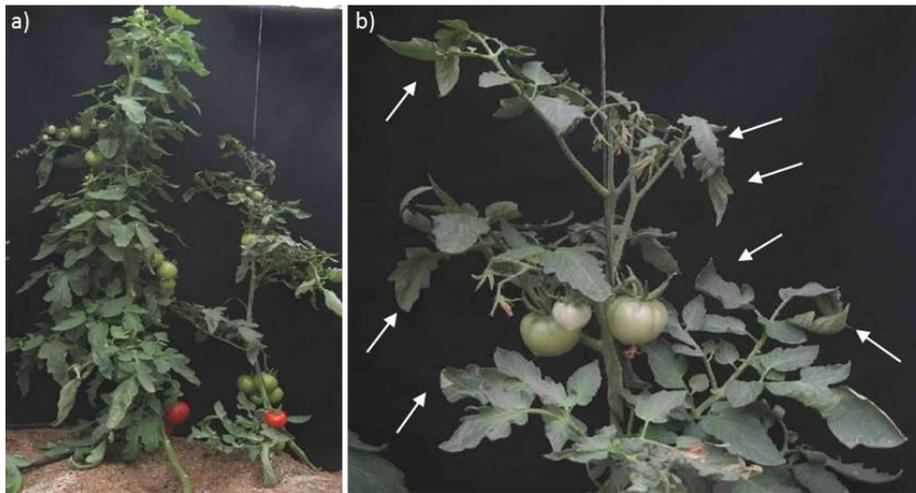


Figura 19.- Plantas TG2 de la línea 901 ET73 cultivadas en el invernadero. a) Comparación entre fenotipo silvestre (izquierda) y mutante con (derecha). b) Detalle de la curvatura de las hojas como consecuencia de la pérdida de turgencia de una planta mutante (flechas blancas).

En el sistema de capilaridad se detectaron las primeras alteraciones diez días después de la germinación y antes de la aplicación del estrés salino. Seis de las 23 plantas cultivadas mostraron un crecimiento reducido y un color verde más oscuro en los cotiledones y hojas desarrolladas hasta este momento (Fig. 20).



Figura 20.- Plantas TG2 de la línea 901 ET73 cultivadas en el sistema hidropónico. Comparación entre fenotipo silvestre (a) y mutante con un desarrollo alterado (b) diez días después de la germinación y antes de aplicar el tratamiento estresante. La barra representa 1 cm.

A los 16 días del tratamiento (26 días tras su germinación), las plantas silvestres tuvieron entre 5 y 6 hojas verdaderas y un tamaño de 7-9 cm mientras las plantas mutantes formaron solamente 3 fitómeros y llegaron a la mitad de la altura de los WT.

En un segundo ensayo, en el cual se compararon 24 plantas cultivadas en ausencia de estrés salino con 25 expuestas a 200 mM, fue posible corroborar las observaciones anteriores y demostrar que el fenotipo mutante era independiente de la presencia de la sal (Fig. 21).



Figura 21.-Plantas TG2 de la línea 901 ET73 con fenotipo silvestre (WT) y mutante (M) tras 26 días a 0 mM y 200 mM de NaCl en el sistema hidropónico. La barra representa 1 cm.

Las segregaciones fueron 18 WT : 6 M, a 0 mM, y 19 WT : 6 M, a 200 mM, lo que está de acuerdo con una mutación recesiva. Los cambios más destacables fueron una reducción del tamaño y de la superficie foliar en los mutantes.

Una vez finalizado el experimento, tras 42 de cultivo en ausencia de sal, se observó la disminución del sistema radicular en los mutantes respecto de las plantas con fenotipo silvestre (Fig. 22).



Figura 22.-Plantas TG2 de la línea 901 ET73 con fenotipo silvestre (WT) y mutante (M) tras 42 días de cultivo sin sal en el sistema hidropónico. La barra representa 1 cm.

El fenotipo mutante se pudo observar también en un experimento *in vitro* en el que se aplicó el estrés salino desde el momento de la germinación. Cultivando semillas en un medio de germinación con NaCl 100 mM las plántulas no eran capaces de desarrollar ninguna raíz y su crecimiento se detenía (datos no mostrados).

Seis plantas mutantes y tres silvestres cultivadas sin estrés salino en el sistema hidropónico se trasladaron al invernadero para continuar su evaluación y obtener semillas de autofecundación y retrocruce. Mientras las silvestres no mostraron alteraciones en estas condiciones, fue posible detectar una serie de cambios en las plantas mutantes. En primer lugar, visualizamos una necrosis de las hojas en el extremo del foliolo y en las hojas más jóvenes de las plantas. Esta necrosis inicial se extendió hasta que afectó a la parte apical de la planta y resultó finalmente en el colapso de la parte superior del tallo principal. Durante este proceso, por debajo de la zona dañada, se inició la formación de brotes laterales. Al alcanzar estos nuevos brotes un cierto nivel de desarrollo, se desencadenó la misma secuencia de alteraciones, finalizando con el colapso de la parte terminal de los nuevos brotes que se habían desarrollado. El resultado de este proceso es una planta con múltiples brotes axilares que no crecen en altura (Fig. 23).

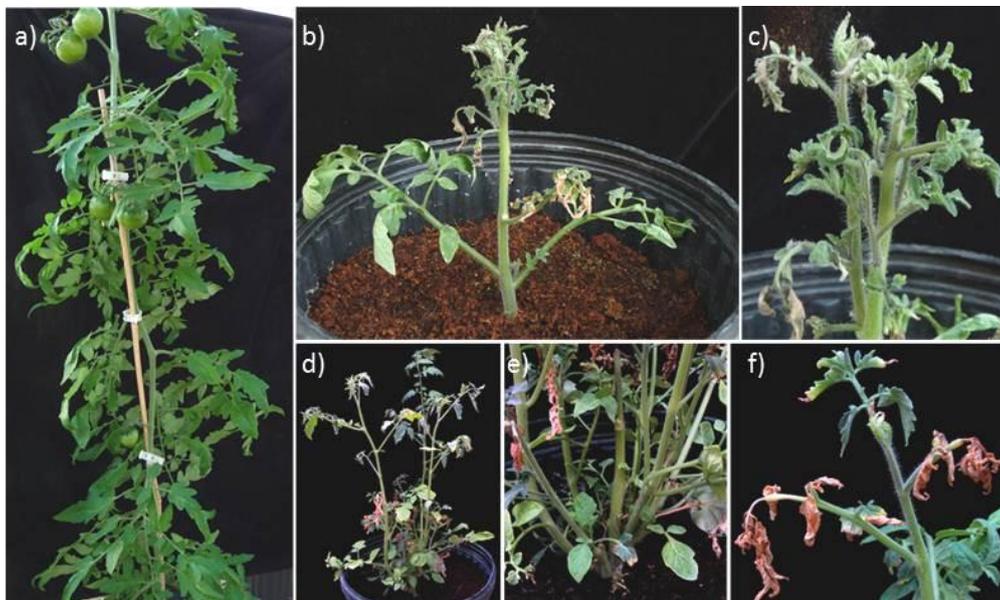


Figura 23.- Plantas TG2 de la línea 901 ET73 cultivadas en el invernadero. a) Fenotipo silvestre con un desarrollo normal y plantas mutantes con diversas alteraciones (b-f). Detalles del fenotipo mutante con falta de turgencia en las hojas (c), una elevada brotación lateral (e) y una senescencia prematura de hojas (f).

Como consecuencia del colapso de los tallos a partir de cierta longitud, la formación de flores fue escasa y el único fruto formado en las seis plantas cultivadas no llegó a madurar, por lo que no se pudieron obtener semillas de las plantas mutantes.

Debido al interés de este mutante y la imposibilidad de obtener descendencias se decidió reintroducir explantes de ápices meristemáticos de plantas cultivadas en el invernadero en cultivo *in vitro*. Por desgracia, tras su esterilización, los brotes fueron incapaces de enraizar y su desarrollo se detuvo (Fig. 24).

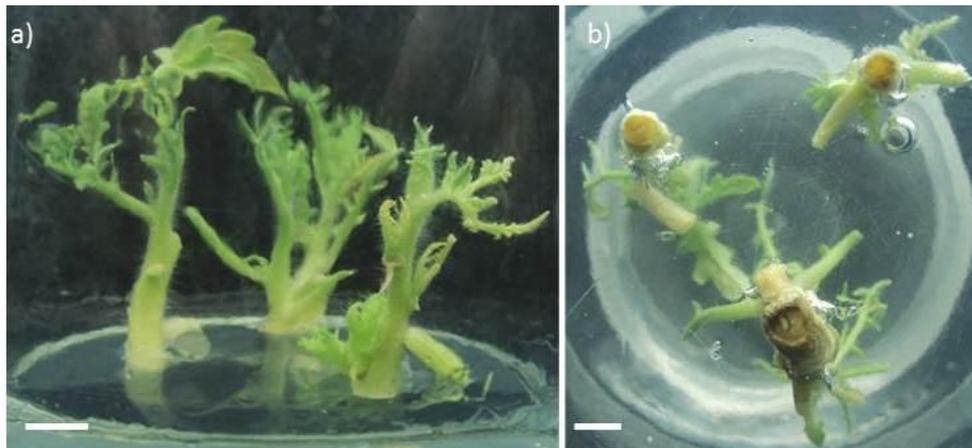


Figura 24.- Ausencia de enraizamiento en explantes de ápices meristemáticos reintroducidos al cultivo *in vitro* a partir de plantas mutantes de la línea 901 ET73. Vista frontal (a) y desde abajo (b) de los explantes cultivados en un medio de enraizamiento. La barra representa 1 cm.

Para profundizar en la caracterización de este mutante y puesto que se habían observado unos engrosamientos anómalos en los tallos de las plantas del invernadero, se realizaron cortes histológicos con floroglucinol (tiñe la lignina de rojo) y azul de anilina (tiñe la calosa de azul). En estas tinciones se vio que el mutante presenta una activación local del cambium vascular causando un engrosamiento del floema (Fig. 25).



Figura 25.- Tallos y cortes histológicos de una planta mutante de la línea 901 ET73. A) Material de partida con engrosamiento en el tallo utilizado para cortes longitudinales. Secciones de engrosamiento teñidas con b) floeroglucinol y c) azul de anilina. D) Material de partida para cortes transversales a 10 cm del ápice. Tinciones con floeroglucinol de e) una planta WT y f) mutante. La barra representa 1 mm.

Aunque se ha comprobado la no cosegregación de fenotipo mutante con un inserto de T-DNA, se va a seguir investigando este mutante por el interés de su fenotipo.

4.5 Detección de mutantes del desarrollo en la colección de líneas T-DNA de *S. pennellii*

En este apartado se presentan los resultados de los tres mutantes afectados en caracteres del desarrollo que se identificaron al cultivar las plantas TG1 en medio sin NaCl (un mutante dominante) y algunas descendencias TG2 (dos mutantes recesivos).

4.5.1 4196 ETSP

Descripción del fenotipo mutante

Entre otras muchas alteraciones, las características principales del mutante fueron el retraso del crecimiento de la parte aérea y la morfología anómala de sus hojas. Las plantas WT que se clonaron junto con esta línea crecían unos quince centímetros hasta alcanzar la tapa del recipiente después de cuatro semanas, mientras que el mutante no crecía más de cinco centímetros en el mismo tiempo. Por otra parte, en cultivo *in vitro*, presentó un buen enraizamiento en la base, así como una gran cantidad de raíces adventicias a diferentes alturas de los tallos. Además, la línea 4196 ETSP tenía folíolos arrugados y gruesos, con bordes menos aserrados. Esta alteración, causada aparentemente por un engrosamiento de las zonas internerviales del limbo, dio a la planta un aspecto craso o suculento. Además, se observó una gran cantidad de tricomas en la superficie de toda la planta (Fig. 26).



Figura 26.- Ápices y hojas de plantas de fenotipo silvestre y plantas TG1 de la línea 4196 ETSP. A) Comparación de ápices de plantas con fenotipo silvestre (izquierda) y mutante (derecha). B) Detalle de la hoja del WT (izquierda) y de las hojas anómalas de la parte terminal de un tallo del mutante (derecha). La barra representa 1 cm.

Tras su aclimatación, se cultivaron varias plantas en el invernadero donde se observó que el fenotipo detectado *in vitro* se mantenía. Las hojas seguían presentado el mismo tipo de alteraciones y el ritmo de crecimiento era muy inferior al de las plantas testigo. Las primeras inflorescencias tardaron más de cinco meses en desarrollarse, cuando en esas mismas condiciones una planta testigo florece a los dos meses. Las inflorescencias eran de menor tamaño y con un menor número de flores (Fig. 27).

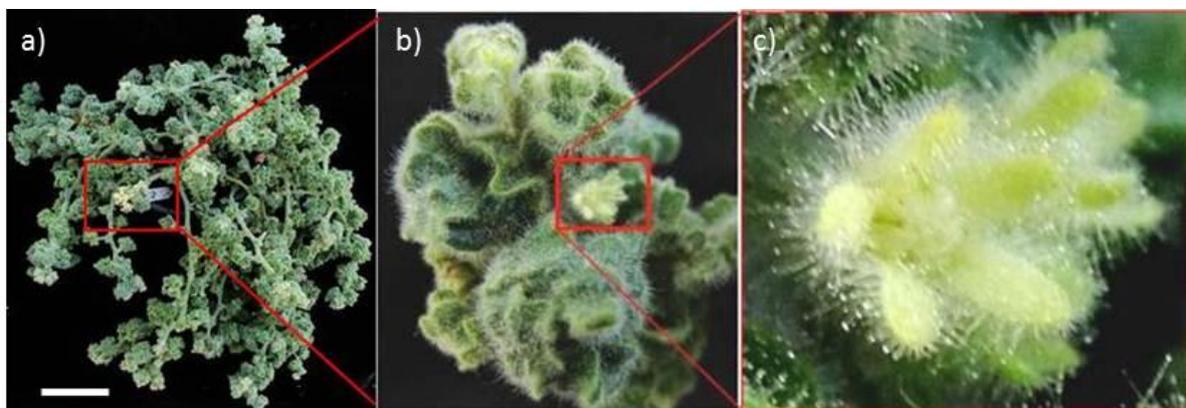


Figura 27.- Planta TG1 de la línea 4196 ETSP cultivada en el invernadero. A) Tamaño tras más de cinco meses de cultivo. Detalle de una inflorescencia (b) y de una flor (c). La barra representa 10 cm.

Las flores del mutante se caracterizaron por presentar un tamaño que no superó los 5 mm, mientras que las de la accesión PE47 miden más de un centímetro de longitud. Además, el desarrollo floral solamente alcanzó un estadio equivalente al de botón floral de las plantas silvestres y no se observaron estadios más avanzados. Como consecuencia, no se pudieron obtener descendencias de autofecundación ni de retrocruce (Fig. 28).



Figura 28.- a) Flores de plantas TG1 de la línea 4196 ETSP (arriba) y de plantas con fenotipo silvestre (abajo). b) corte longitudinal de flores en el máximo estadio de desarrollo (p.ej. botón floral) de la línea WT (izquierda) y de 4196 ETSP (derecha). La barra representa 1 cm.

Al no obtener descendencias de autofecundación o retrocruce, no se ha podido llevar a cabo una caracterización genética propiamente dicha, incluyendo el análisis del modo de herencia (en principio, se trata de un mutante dominante, pero no se puede descartar que haya semidominancia), la estimación del número de insertos T-DNA y el análisis de cosegregación. Para avanzar de algún modo en la caracterización de este mutante, hemos llevado a cabo el análisis del gen delator, a fin de estudiar su patrón de expresión. Hay que recordar que, al utilizar una trampa de intensificadores para obtener las plantas transgénicas, el patrón del gen delator puede dar pistas sobre el patrón de expresión del gen mutado.

Análisis de la expresión del gen delator

El análisis de la expresión del gen delator dio respuesta positiva en múltiples tejidos procedentes de plantas cultivadas en el invernadero. En prácticamente todos los tallos evaluados se observaba una expresión clara a lo largo de todo el tejido y, preferentemente, en las cercanías de la axila de las hojas. Las hojas más jóvenes presentaban una coloración intensa en prácticamente todos sus tejidos mientras que las más desarrolladas tenían una mayor expresión en peciolo y raquis. En el resto de tejidos analizados no se observó ninguna expresión (Fig. 29).

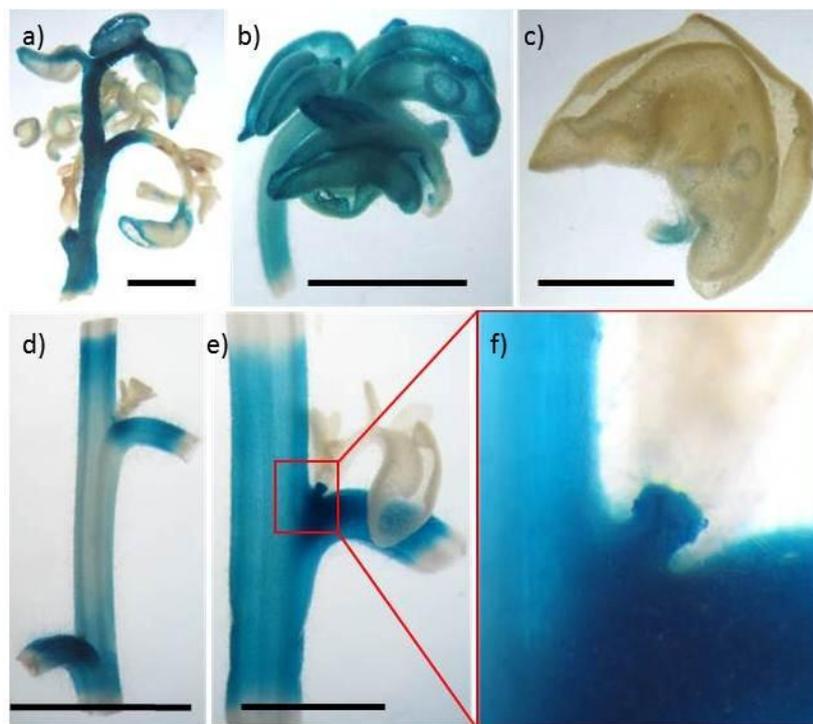


Figura 29.- Expresión GUS en distintos tejidos de plantas TG1 de la línea 4196 ETSP cultivadas en el invernadero. Tinción GUS en la parte terminal de un tallo (a); una hoja joven (b) y una hoja desarrollada (c). Expresión GUS en segmentos de tallo (d, e) y un detalle de la parte basal del peciolo de una hoja (f). La barra representa 1 cm.

Teniendo en cuenta que parece haber una asociación entre el fenotipo mutante y los tejidos u órganos en donde se localiza la expresión del delator (GUS) presente en la trampa de intensificadores, los resultados sugieren que el T-DNA podría haber etiquetado el gen cuya alteración genera el fenotipo mutante, o al menos podría haberse insertado en la vecindad del mismo. Si así fuera, se podría abordar la identificación del gen mediante Anchor-PCR en un periodo de tiempo relativamente corto. No obstante, en este caso, puede que se precise un esfuerzo adicional porque el análisis Southern revela que esta línea tiene 4 insertos de T-

DNA. Como no es factible obtener progenies de autofecundación o retrocruce, no se pueden separar los insertos mediante segregación en la descendencia. Por tanto, la única solución es amplificar las secuencias vecinas a los cuatro insertos, diseñar los correspondientes vectores (silenciamiento y sobreexpresión), obtener plantas transgénicas y, a continuación, evaluar el fenotipo para inferir cuál es el gen alterado.

4.5.2 4166 ETSP

Se trata de un mutante recesivo que se identificó al cultivar las semillas TG2 que se habían podido obtener por autofecundación de algunas de las plantas TG1 cultivadas en el invernadero. Estas semillas se esterilizaron y se cultivaron en medio de germinación para intentar identificar plantas con su fenotipo alterado.

Descripción del fenotipo mutante

En un ensayo inicial se consiguió la germinación de 25 plantas. Entre estas plantas se vieron cuatro con una mayor ramificación que el WT. Las plantas mutantes presentaban una mayor brotación a partir de las yemas axilares. La penetrancia era del 100% pero la expresividad (p.ej. el grado de alteración fenotípica) oscilaba planta a planta. En los casos más extremos, las plantas tenían pérdida de dominancia apical, con múltiples tallos y menor altura y, alguna de ellas, una clorosis significativa (Fig. 30).



Figura 30.- Plantas TG2 de fenotipo silvestre y TG2 mutante de la línea 4166 ETSP cultivadas en el medio de enraizamiento. a) Comparación entre plantas silvestres (izquierda) y mutantes (derecha). b) Tres plantas TG2 con fenotipo mutante de la línea 4166 ETSP cultivadas en medio de enraizamiento con diferentes grados de ramificación tras 8 semanas de cultivo *in vitro*. La barra representa 1 cm.

Se realizó un segundo experimento para corroborar el fenotipo y, de 32 semillas germinadas *in vitro*, se identificaron seis plantas mutantes con el mismo fenotipo observado en el primer experimento.

Tras su aclimatación y cultivo en el invernadero, las plantas mutantes mostraron un crecimiento más ramificado y compacto que las correspondientes WT. En la primera fase del cultivo, las plantas mutantes parecían acumular antocianinas en las hojas. Además, la clorosis, observada en cultivo *in vitro*, también se detectó en alguna planta mutante cultivada en el invernadero (Fig. 31).



Figura 31.- Plantas TG2 de fenotipo silvestre y TG2 mutante de la línea 4166 ETSP cultivadas durante seis meses en invernadero. a) Comparación de plantas silvestres (izquierda) y mutantes (derecha). Hojas de las plantas mutantes con acumulación de antocianinas (b) o síntomas de clorosis (c). La barra representa 1 cm.

En las plantas mutantes también se observó cierto retraso en la formación de los órganos reproductivos. La arquitectura de las inflorescencias y el desarrollo floral de los mutantes fueron comparables a los de las plantas silvestres. Esta similitud del desarrollo reproductivo también se reflejó en la dificultad de desarrollar frutos y semillas, por lo cual, hasta el momento no ha sido posible obtener descendencias de las plantas mutantes.

Caracterización genética del mutante

En el primer experimento se identificaron 4 plantas mutantes de 25 evaluadas. En el segundo se identificaron 6 plantas mutantes de 32 evaluadas (Tabla 12).

Tabla 12.-Segregación fenotípica del mutante 4166 ETSP

Experimento 1	WT	M
Observados	21	4
Esperados (3:1)	18,75	6,25
$\chi^2=1,08$		
Experimento 2	WT	M
Observados	26	6
Esperados (3:1)	24	8
$\chi^2=0,67$		

Tras comprobar mediante un test χ^2 de contingencia que era posible unir los datos de los dos experimentos ($\chi^2 = 0,07 < 3,84 \chi^2_{1\text{ gl}} (5\%)$) se analizó la segregación correspondiente a los datos acumulados (Tabla 13).

Tabla 13.- Segregación fenotípica del mutante 4166 ETSP

Total	WT	M
Observados	47	10
Esperados (3:1)	42,75	14,25
$\chi^2=1,69$		

El resultado de la prueba χ^2 indica que no hay motivo para dudar de que el fenotipo esté causado por una mutación monogénica recesiva (47 WT : 10 M; $\chi^2 = 1,69 < 3,84 \chi^2_{1\text{ gl}} (5\%)$).

Determinación del número de insertos T-DNA

Para estimar el número de insertos de T-DNA que ha integrado esta línea se analizó la resistencia a la kanamicina de las plantas TG2. Para ello, se evaluó *in vitro* la capacidad de enraizamiento de yemas axilares en un medio IAA $0,1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ suplementado con $100 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de kanamicina. Se evaluó la resistencia a la kanamicina en 31 plantas TG2 y se analizó el grado de ajuste de la segregación observada a las hipótesis de que en la TG1 hubiera 1

inserto (en cuyo caso, 3/4 partes de las plantas TG2 serían resistentes), 2 insertos (15/16 de las plantas TG2 serían resistentes), o más insertos de T-DNA funcional. Los resultados observados fueron los siguientes (Tabla 14).

Tabla 14.- Segregación para el carácter resistencia a la kanamicina del mutante 4166 ETSP

Total	KanR	KanS
Observados	26	5
Esperados 1 inserto (3:1)	23,25	7,75
$\chi^2=1,30$		
Esperados 2 insertos (15:1)	29,06	1,94
$\chi^2=5,16$		

El resultado de la análisis χ^2 indica que no hay motivo para dudar de que en esta línea T-DNA se haya insertado un único T-DNA con *nptII* funcional (26 KanR : 5 KanS; $\chi^2= 1,30 < 3,84 \chi^2_{1\text{ gl}}$ (5%).

Además, esta línea fue evaluada a nivel molecular mediante un análisis Southern Blot. El resultado mostró que porta dos insertos de T-DNA completos y uno truncado (Fig. 32).

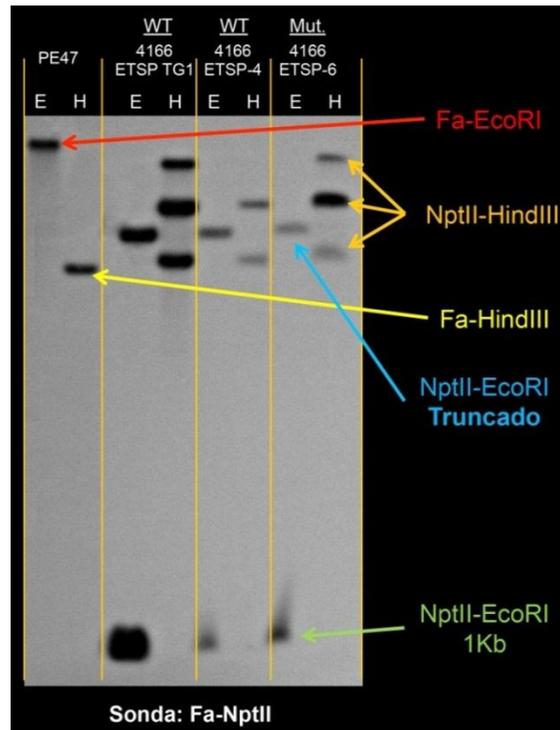


Figura 32.-Hibridación Southern Blot con la sonda *FA-nptII* de las plantas PE47 (testigo sin T-DNA), 4166 ETSP TG1, 4166-4 ETSP TG2 WT, 4166-6 ETSP TG2 M. Cada una de las muestras de ADN las encontramos por duplicado, digerido con las enzimas de restricción.

Aunque el resultado del análisis Southern (dos insertos con *nptII* y otro truncado) no parece coincidir con el obtenido a través de la evaluación de la resistencia a la kanamicina (un inserto con *nptII* funcional), la aparente discrepancia se puede explicar de dos formas. En primer lugar, puede que haya dos insertos completos que hayan quedado muy próximos (p.ej. en situación de ligamiento incompleto) o que se hayan integrado en tándem (p.ej. ligamiento completo). En este caso, desde el punto de vista del análisis de segregación para resistencia a la kanamicina, los dos insertos actuarían como uno solo. La otra posibilidad es que uno de esos dos insertos completos no sea capaz de conferir resistencia a la kanamicina por haberse insertado en una región que dificulte su expresión (p.ej. una zona de ADN altamente repetitivo y/o de heterocromatina constitutiva) o por tener alguna alteración en su secuencia. Por lo que respecta a este último, conviene resaltar que el análisis Southern detecta la presencia de una secuencia siempre que haya suficiente homología con la sonda diseñada al efecto; no obstante, la sonda puede aparear con una secuencia alterada (p.ej. no funcional) siempre y cuando la zona de homología sea suficientemente extensa.

Determinación de la cosegregación entre T-DNA y fenotipo mutante

Con el propósito de obtener información sobre si el fenotipo mutante se debe a la inserción de un T-DNA, se analizó la asociación entre la presencia de un gen *nptII* funcional y el fenotipo mutante. Conviene destacar que con la presencia de una única planta que presente fenotipo mutante y que no sea resistente a la kanamicina se podría concluir la no cosegregación entre un inserto de T-DNA con un gen *nptII* funcional y el gen causante de la mutación. En este caso, la planta TG2 4166-12 ETSP presenta fenotipo mutante y es sensible al antibiótico, lo cual indica que las alteraciones en esta línea no fueron causadas por una copia completa del T-DNA.

Al ver estos resultados se llevó a cabo un experimento complementario para establecer, por técnicas de genética molecular, si el fenotipo mutante estaba causado por la inserción del T-DNA truncado detectado en el Southern Blot, o por la inserción de parte del cuerpo del vector. Para ello se realizaron diversas reacciones de PCR con el objeto de amplificar la totalidad del inserto T-DNA y parte del cuerpo del vector (Fig. 33).



Figura 33.- Reacciones de PCR realizadas en cuatro plantas TG2 de la línea 4166 ETSP con combinaciones de cebadores para amplificar por PCR la totalidad del inserto T-DNA y parte del cuerpo del vector: 6 y 10 (M – KanR), 12 (M – KanS), 19 (WT – KanS), el testigo PE47 y el vector pD991 (C+). Las letras corresponden con las diferentes combinaciones de cebadores utilizadas (ver apartado 3.8.2); (+) control interno de la reacción de PCR.

Tras realizar este experimento se pudo constatar que el fenotipo mutante de la línea 4166-12 ETSP no se debe a la presencia de ninguno de los fragmentos del T-DNA, ni de parte del cuerpo del vector, por lo que la mutación responsable de dicho fenotipo se atribuye a un evento de variación somaclonal.

4.5.3 4025 ETSP

Este mutante recesivo se identificó al cultivar las semillas TG2 que se habían podido obtener por autofecundación de algunas de las plantas TG1 cultivadas en el invernadero.

Descripción del fenotipo mutante

La primera vez que se observó una alteración fenotípica en las plantas TG2 de esta línea ocurrió en una siembra *in vivo*. En concreto, de las plantas cultivadas en el invernadero, 8 exhibieron un crecimiento muy reducido. Después de cuatro meses de cultivo las plantas con desarrollo silvestre habían alcanzado una longitud de casi un metro mientras que las plantas mutantes medían entre 4 y 8 cm (Fig. 34).

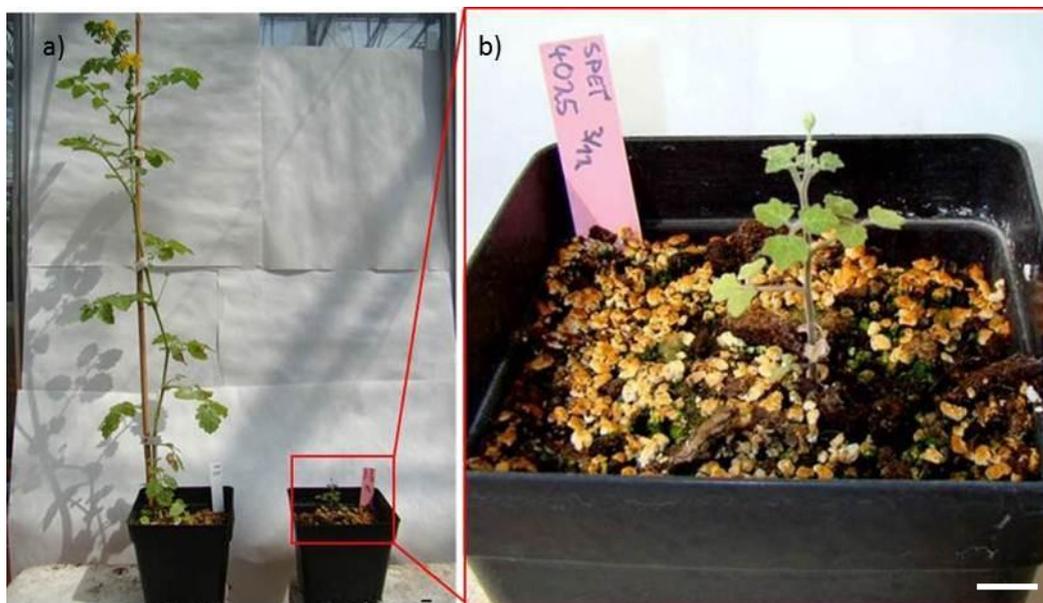


Figura 34.- Plantas TG2 de la línea 4025 ETSP en el invernadero tras 4 meses de cultivo. a) Comparación entre silvestre (izquierda) y mutante (derecha). b) Aumento de la planta mutante. La barra representa 1 cm.

Para observar el desarrollo de esta línea en otras condiciones de cultivo, se realizó una siembra *in vitro* tras la esterilización de un lote de semillas. En estas condiciones también se observó claramente el fenotipo mutante, que se manifestó como la imposibilidad de desarrollar la raíz embrionaria y una gran dificultad en emitir raíces secundarias. Esta dificultad en el desarrollo radicular podía ser la causa del escaso desarrollo vegetativo observado en el anterior experimento en el invernadero. Cuando se cultivaron los ápices meristemáticos de estas plantas en un medio de enraizamiento se pudo observar que las

raíces adventicias tampoco eran capaces de desarrollarse como en las plantas WT, presentando un crecimiento inicial que se detenía tras pocos milímetros (Fig. 35).

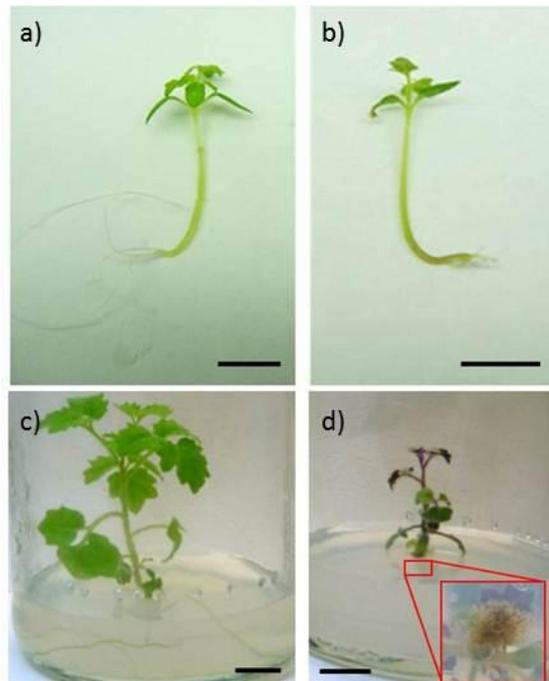


Figura 35.- Plantas TG2 de la línea 4025 ETSP en el cultivo *in vitro*. Plántulas silvestre (a) y mutante (b) procedentes de semillas. Plantas silvestre (c) y mutante (d) axénicas procedentes del cultivo de ápices meristemáticos en medio de enraizamiento. La barra representa 1 cm.

Efecto de la adición de hormonas

Dada la influencia que tienen las hormonas vegetales en el desarrollo de las plantas y, en concreto, las auxinas en el enraizamiento, se realizaron diferentes experimentos para estudiar la influencia de la adición exógena de auxinas en las plantas mutantes. En primer lugar se evaluó el efecto de diferentes concentraciones de IAA, la hormona vegetal más empleada para favorecer el desarrollo radicular. Todas las concentraciones empleadas (0 a $10 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) permitieron el enraizamiento del testigo. Sin embargo, los ápices meristemáticos del mutante no fueron capaces de formar raíces en ningún caso y el aumento de la concentración de IAA solo intensificó la formación de callo desorganizado en la base del explante y una reducción del crecimiento de la parte aérea (Fig. 36).



Figura 36.- Desarrollo *in vitro* de raíces y parte aérea a partir de explantes de ápice meristemático de plantas TG2 de la línea 4025 ETSP silvestres (arriba) y mutantes (abajo) en medios con concentraciones crecientes de AIA (0; 0,1; 1 y 10 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$). La barra representa 1 cm.

Al no observar ninguna respuesta mediante la adición de AIA, nos planteamos evaluar el comportamiento de este mutante en medios de enraizamiento a los que se les adicionaron otras auxinas.

Los ápices meristemáticos de plantas TG2 con fenotipo WT, enraizaron normalmente en medios con 0,1 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de AIA, AIB y 4CPA. El NAA aumentó la densidad radicular en el medio, el 2,4,5-T produjo la formación de raíces más cortas y el 2,4-D promovió el desarrollo de raíces y un callo desorganizado en la zona de corte. En las plantas con fenotipo WT, el empleo de estas auxinas a una concentración más elevada (0,5 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) condujo, en general, a una reducción del crecimiento de la parte aérea y un desarrollo más anómalo del observado a baja concentración. En cualquier caso, la adición al medio de 0,1 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ y 0,5 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de AIA, ANA, AIB, 2,4-D, 2,4,5-T, y 4CPA no estimuló el enraizamiento de los ápices de plantas mutantes (Fig. 37).

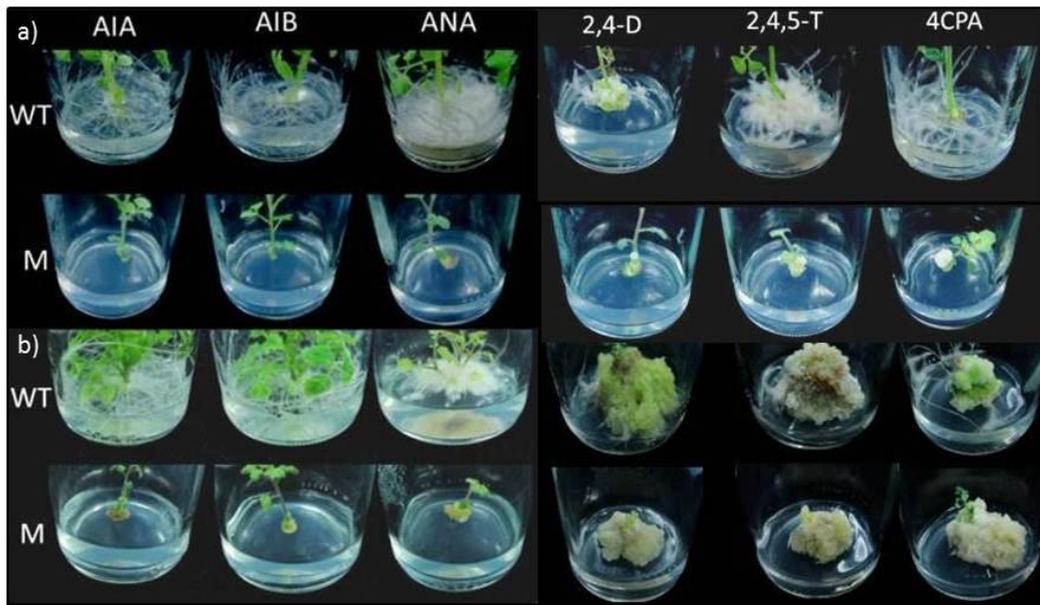


Figura 37.- Desarrollo *in vitro* de raíces y parte aérea a partir de explantes de ápice meristemático de plantas TG2 de la línea 4025 ETSP, silvestres y mutantes, en medios con AIA, ANA, AIB, 2,4-D, 2,4,5-T, y 4CPA a dos concentraciones. Aplicación de $0,1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ (a) y $0,5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ (b) de cada auxina. La barra representa 1 cm.

Para comprobar si había otros procesos del desarrollo afectados en el mutante se evaluaron explantes de hoja en diferentes medios de cultivo. En concreto, se evaluó el desarrollo en un medio organogénico (IKZ 4.0 4.0 1.0) con una mezcla de dos citoquininas (kinetina y trans-zeatina) y una auxina (ácido indolacético). Además, también se evaluó el desarrollo de estos explantes en otros medios modificados a partir del anterior, en los que se eliminaban una o las dos citoquininas (IK 4.0 4.0 e I 4.0, respectivamente).

En el medio organogénico, suplementado con dos citoquininas (IKZ), la respuesta de los explantes de plantas mutantes fue comparable al de las plantas silvestres, siendo capaces en ambos casos, de producir yemas adventicias a partir de los explantes de hoja. Al eliminar la zeatina se redujo la respuesta morfogénica aunque, en ambos casos, testigo y mutante, fueron capaces de desarrollar callo desorganizado. Por último, en un medio suplementado únicamente con auxina, los explantes de hoja de las plantas silvestres desarrollaron un gran número de raíces, mientras que los de las plantas mutantes no fueron capaces de regenerar ni siquiera una raíz adventicia (Fig. 38).

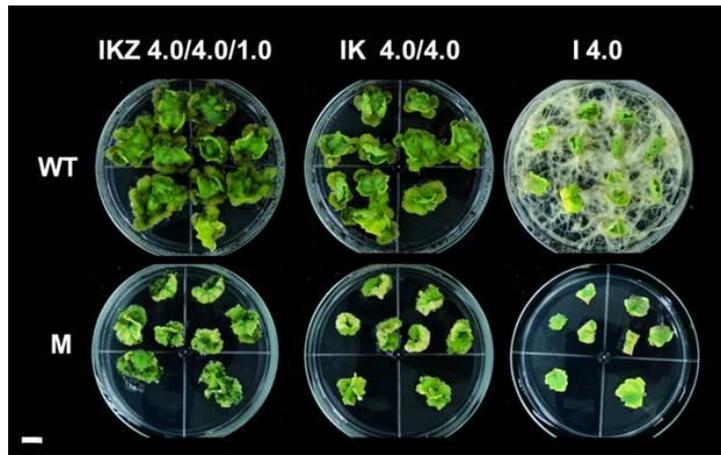


Figura 38.- Respuesta morfogénica a partir de explantes de hoja de plantas TG2 de la línea 4025 ETSP, silvestres y mutantes, en los medios IKZ 4.0 4.0 1.0, IK 4.0 4.0 e I 4.0. La barra representa 1 cm.

Con estos experimentos se pudo comprobar que el enraizamiento adventicio estaba claramente afectado en el mutante, no sólo a partir de ápices meristemáticos sino también a partir de explantes de hoja, un sistema utilizado frecuentemente para el estudio de este proceso. La adición de distintas auxinas y a diferentes concentraciones en el medio de cultivo no ha permitido revertir, ni siquiera parcialmente, el fenotipo mutante. Sin embargo, otro proceso en el que también influye la presencia de auxinas exógenas, como es la organogénesis adventicia, no parece estar afectado en el mutante.

Injertos entre mutante y silvestre

Tras analizar los datos obtenidos en los ensayos con diferentes auxinas nos planteamos evaluar su comportamiento cuando se injerta con material silvestre. Para ello se realizaron los injertos en ambas direcciones a partir de plantas axénicas de genotipo mutante y testigo. Los resultados obtenidos indicaron que cuando se hace el injerto con la parte aérea del mutante y el portainjerto del testigo el enraizamiento se produce sin ninguna diferencia con una planta testigo. Sin embargo, cuando se hace a la inversa, el fenotipo mutante aparece y la planta no es capaz de enraizar (Fig. 39).

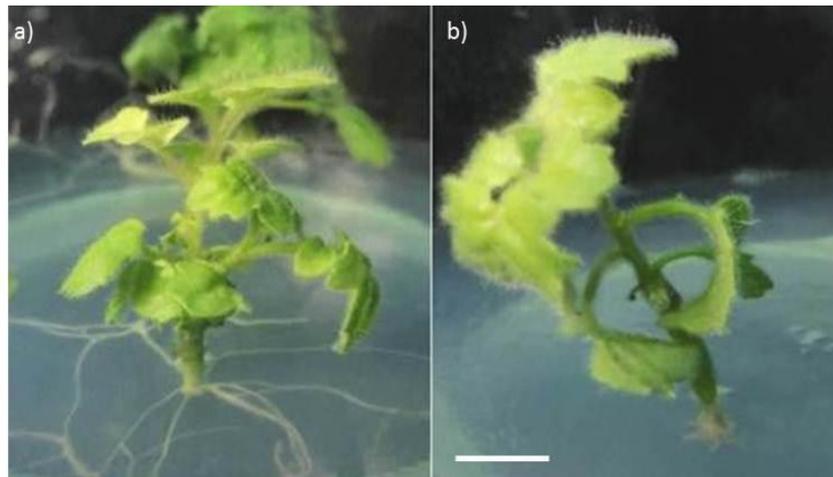


Figura 39.- Injerto en condiciones axénicas entre plantas silvestres y mutantes de la línea 4025 ETSP. Ápice de planta mutante sobre patrón silvestre (a) y ápice planta silvestre sobre patrón mutante (b). La barra representa 1 cm.

Como conclusión se puede afirmar que en un injerto que combine mutante y testigo, el fenotipo de la planta lo confiere el genotipo del portainjerto.

Caracterización genética del mutante

Como puede verse en la tabla 15, se identificaron 9 plantas mutantes de un total de 50.

Tabla 15.- Segregación fenotípica del mutante 4025 ETSP

Total	WT	M
Observados	41	9
Esperados (3:1)	37,5	12,5
$\chi^2=1,31$		

Los resultados del análisis χ^2 indican que no hay motivo para dudar de que este fenotipo esté causado por una mutación monogénica recesiva (41 WT : 9 M; $\chi^2 = 1,31 < 3,84 \chi^2_{1\text{ gl}}(5\%)$).

Determinación del número de insertos T-DNA

Para estimar el número de insertos de T-DNA que ha integrado esta línea se analizó la resistencia a la kanamicina de las plantas TG2. Para ello, se evaluó *in vitro* la capacidad de enraizamiento de yemas axilares en un medio suplementado con 0,1 mg·L⁻¹ de IAA y 100 mg·L⁻¹ de kanamicina. En este caso, dadas las dificultades de enraizamiento de las plantas mutantes, se analizó también la resistencia a la kanamicina cultivando explantes de hoja en

un medio de regeneración (IKZ 4.0 4.0 1.0) suplementado con $100 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de kanamicina. A continuación, se analizó el número plantas resistentes y sensibles para inferir el número de insertos T-DNA con *nptII* funcional en 50 plantas TG2. Los resultados fueron los siguientes:

Tabla 16.- Segregación para el carácter resistencia a la kanamicina del mutante 4025 ETSP

	KanR	KanS
Observados	38	12
Esperados 1 inserto (3:1)	37,5	12,5
$\chi^2=0,03$		

Los resultados indican que no hay motivo para dudar de que en esta línea T-DNA se ha insertado un único T-DNA con *nptII* funcional ($38 \text{ KanR} : 12 \text{ KanS}$; $\chi^2 = 0,03 < 3,84 \chi^2_{1 \text{ gl}} (5\%)$).

Además, esta línea se evaluó a nivel molecular mediante un análisis Southern Blot. El análisis Southern mostró que esta línea es portadora de dos insertos de T-DNA, uno completo y otro truncado, lo cual explica que segregue para un único inserto cuando se evalúa la resistencia a la kanamicina (Fig. 40).

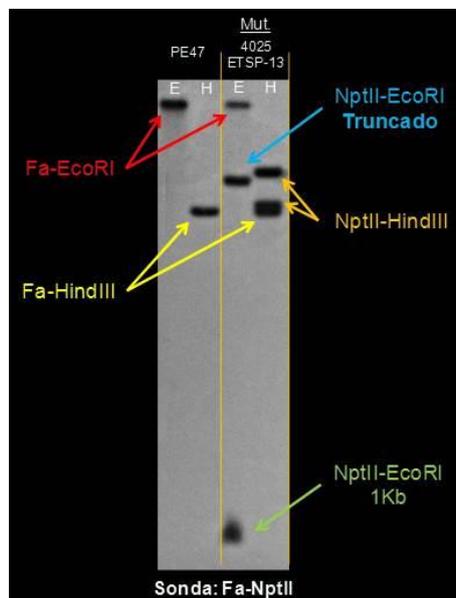


Figura 40.- Hibridación Southern Blot con la sonda *FA-nptII* de las plantas PE47 (testigo sin T-DNA) y 4025-13 ETSP TG2mutante (M). Cada una de las muestras de ADN se encuentran por duplicado, digerido con las enzimas de restricción *EcoRI* (E) y *HindIII* (H).

Análisis de cosegregación entre un inserto T-DNA y el fenotipo mutante

Con el fin de obtener información sobre el origen de la mutación, se estudió la asociación entre la presencia del único inserto con un gen *nptII* y el fenotipo mutante. En el caso de que haya cosegregación entre el inserto de T-DNA y la mutación se debería observar la siguiente distribución:

2/4 de plantas WT-KanR correspondientes a las plantas hemicigóticas para el T-DNA

1/4 de plantas WT-KanS correspondientes a las plantas acigóticas para el T-DNA

1/4 de plantas M-KanR correspondientes a las plantas homocigóticas para el T-DNA.

La segregación observada fue la siguiente:

Tabla 17.- Segregación de la línea 4025 ETSP para el fenotipo y la resistencia a kanamicina.

	WT		M	
	KanR	KanS	KanR	KanS
Observados	29	12	9	0
Esperados 1 inserto CS (2:1:1:-)	25	12,5	12,5	-
$\chi^2=1,64$				

Los resultados indican que no hay motivo para dudar de que en esta línea T-DNA se haya insertado un único T-DNA con *nptII* funcional y que este inserto es el causante del fenotipo mutante en homocigosis (29 WT-KanR : 12 WT-KanS : 9 M-KanR; $\chi^2 = 1,64 < 5,99 \chi^2_{2\text{ gl}}(5\%)$).

Expresión del gen *uidA*

Se observó expresión del gen delator tanto en las plantas WT-KanR como en las plantas M-KanR. En ambos casos la expresión se observó fundamentalmente en la parte radicular (Fig. 41).

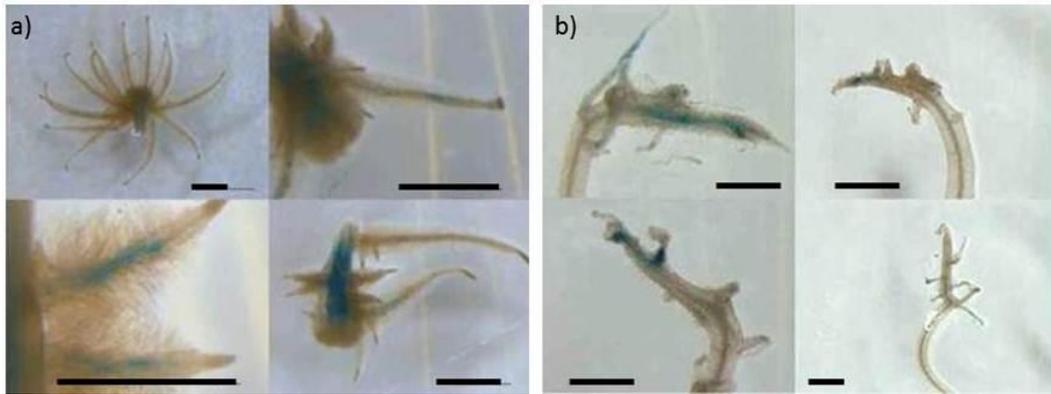


Figura 41.- Visualización de la expresión del gen *uidA* mediante el test histoquímico X-gluc en raíces de plantas 4025 ETSP. Tinciones en plantas WT KanR (a) y M KanR (b). La barra representa 1 mm.

La existencia de cosegregación inserto – mutación y la expresión del gen delator en el órgano afectado por la mutación indican que el gen *uidA* nos puede servir para estudiar el patrón de expresión del gen alterado en esta línea. De hecho, esta línea sería un claro ejemplo de la utilidad del empleo de trampas para conseguir información adicional sobre el gen que ha sido alterado en un mutante.

Clonación del gen etiquetado mediante Anchor-PCR

Para identificar las regiones flanqueantes del T-DNA y llegar a identificar el gen alterado en el mutante, se realizó un Anchor-PCR. Esta técnica permite amplificar los bordes del T-DNA junto con un fragmento de ADN genómico adyacente. Tras amplificar esa región se puede comparar la secuencia con el genoma de referencia de la especie silvestre (Bolger *et al.*, 2014) para averiguar dónde se ha insertado el T-DNA. El análisis bioinformático de las secuencias flanqueantes al borde derecho del T-DNA indicó que dicho inserto se localiza a 4,2 kb corriente arriba del gen Sopen01g041390, en el cromosoma 1 del genoma de *S. pennellii* (Fig. 42).

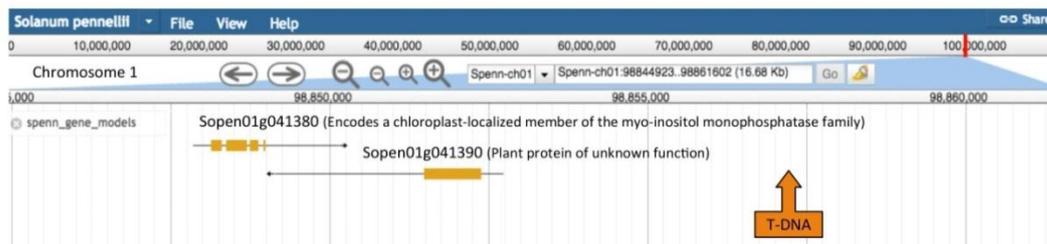


Figura 42.-Localización genómica del inserto de T-DNA de la línea 4025 ETSP en el genoma de *S. pennellii*.

El gen Sopen01g041390 codifica una proteína de función desconocida. La base de datos SGN (<https://solgenomics.net>) sólo muestra información sobre la organización genómica del gen, el cual contiene dos exones y un intrón.

Con el fin de obtener información sobre la posible función de dicho gen, a partir de su secuencia proteica, se identificó el gen homólogo AT3G04860 de *Arabidopsis thaliana*. A partir de esta información, utilizando la base de datos Arabidopsis eFP Browser (www.bar.utoronto.ca/efp/cgi-bin/efpWeb.cgi), se pudo comprobar que este gen se expresa mayoritariamente en las células meristemáticas de la raíz (Fig. 43).

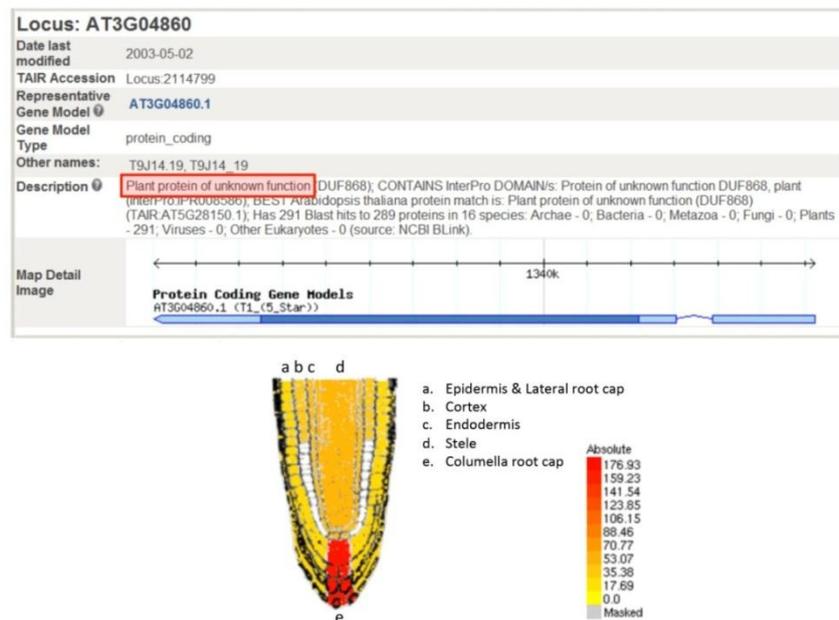


Figura 43.-Información sobre el gen de *Arabidopsis thaliana* que presenta mayor homología con Sopen01g041390.

El siguiente paso sería el análisis funcional de este gen que, por el fenotipo mostrado, parece ser clave en el desarrollo radicular de *S. pennellii*. Para ello, se van a diseñar las construcciones que nos permitan la sobreexpresión y anulación de expresión de este gen para obtener plantas transgénicas de *S. pennellii*, tomate y otras especies silvestres relacionadas. También se va a evaluar el nivel de expresión de este gen en el mutante y en plantas testigo. Además, se evaluará el nivel de expresión de otros genes previamente identificados que presumiblemente intervienen en el desarrollo radicular.

5 Discusión

La generación de mutantes y su análisis fenotípico detallado ha sido uno de los métodos más exitosos para conocer qué genes controlan los diferentes caracteres de una planta (Emmanuel y Levy, 2002; Shibata, 2005; Barone *et al.*, 2008; Kuromori *et al.*, 2009; Sikora *et al.*, 2012). Dentro de las técnicas para la generación de mutantes, la mutagénesis insercional ofrece una importante ventaja que la convierte en una de las herramientas más potentes, ya que al generarse los mutantes con un fragmento de ADN de secuencia conocida, se facilita enormemente la identificación y clonación del gen afectado (Holtorf *et al.*, 2002; Radhamony *et al.*, 2005; Leoni *et al.*, 2011). Aunque esta estrategia se ve limitada por la eficacia del método para generar colecciones amplias de líneas transgénicas, ya se han identificado por esta vía varios genes relacionados con la respuesta a los estreses abióticos en diferentes especies (Vij y Tyagi, 2007; Pineda *et al.*, 2012). También se ha comprobado su eficacia en la identificación de genes implicados en caracteres del desarrollo del tomate, tanto en trabajos nuestros (*Arlequin/TAGL1*: Giménez *et al.*, 2010; Pineda *et al.*, 2010; *ENO*: Fernández-Lozano *et al.*, 2015; *MC-VIN*: Yuste-Lisbona *et al.*, 2016) como de otros investigadores (*Cf-9*: Jones *et al.*, 1994; *Dwarf*: Bishop *et al.*, 1996; *DCL*: Keddie *et al.*, 1996; *FEEBLY*: Van der Biezen *et al.*, 1996; *Cf-4*: Takken *et al.*, 1998; *Tm-2 2*: Lanfermeijer *et al.*, 2003; *ANT1*: Mathews *et al.*, 2003; *LeCER6*: Vogg *et al.*, 2004; *LePT4*: Nagy *et al.*, 2005; *TAP3*: De Martino *et al.*, 2006).

La presente tesis doctoral se enmarca en un proyecto que se inició hace más de diez años en colaboración con los grupos del Dr. Rafael Lozano (Universidad de Almería) y la Dra. María del Carmen Bolarín (CEBAS-CSIC), y que tiene como objetivo principal la identificación y el aislamiento de genes claves en procesos de desarrollo y tolerancia a estreses abióticos en tomate y especies silvestres relacionadas mediante la mutagénesis insercional. Los pasos esenciales en este proyecto son la generación de una colección de plantas transgénicas suficientemente grande para identificar mutantes relacionados con estos caracteres, el diseño de metodologías que permitan un escrutinio eficaz para la detección de mutantes, la caracterización lo más completa posible de esos mutantes y, por último, la identificación y clonación del gen responsable del fenotipo. Conviene resaltar también que, aparte de la

importancia económica que tiene el tomate, la selección de esta especie como objetivo para el proyecto abre la posibilidad de estudiar procesos que no se podrían estudiar en otros organismos modelo (p.ej. desarrollo y maduración de frutos carnosos), o que se evaluarían con más dificultad en *Arabidopsis* (p.ej. transporte iónico a larga distancia) (Essah *et al.*, 2003; Tester y Bacic, 2005; Olías *et al.*, 2009b).

En esta tesis doctoral se ha trabajado fundamentalmente en la obtención de una amplia colección de líneas T-DNA de *S. pennellii* mediante transformación por cocultivo de explantes primarios con *Agrobacterium tumefaciens*. Se ha elegido esta especie tolerante a la sequía y la salinidad para identificar genes clave en los mecanismos de tolerancia a estos estreses porque al ser un material filogenéticamente relacionado con el tomate se espera que las funciones y la base genética en que se fundamentan estas características sean muy parecidas y, por tanto, transferibles a la especie cultivada. También se han realizado grandes esfuerzos en la identificación y caracterización de mutantes alterados en la tolerancia a estreses de tipo abiótico, o en caracteres más o menos relacionados con este tipo de estrés, a partir del escrutinio de esta colección. Para ello, ha sido necesario poner a punto una serie de métodos para analizar el comportamiento de estas líneas al verse sometidas a tratamientos estresantes. Adicionalmente, se han analizado también diferentes líneas T-DNA de tomate en las que ya se había identificado algún fenotipo interesante mediante un nuevo sistema de evaluación desarrollado en este proyecto.

5.1 Obtención de una colección de plantas transgénicas de *Solanum pennellii*

El primer objetivo de esta tesis doctoral fue la obtención de una colección de plantas transgénicas diploides de *S. pennellii* con una trampa de intensificadores. Desde la primera transformación de tomate con *Agrobacterium* hace treinta años (McCormick *et al.*, 1986) se han desarrollado diversos protocolos para esta especie. Aunque en ese mismo año se describió un método para la transformación de plantas procedentes de un cruce interespecífico entre tomate y la accesión LA716 de *S. pennellii* (Chyi *et al.*, 1986), el primer protocolo de transformación para esta especie silvestre se publicó en 1993 (Rudas *et al.*, 1993). Años después, nuestro grupo publicó un método de transformación a partir de

explantes de hoja de *S. pennellii* (Gisbert *et al.*, 1999) con una eficacia de transformación del 6,1%. Sin embargo, para llevar a cabo un programa de mutagénesis insercional se requiere una eficacia de transformación mucho más elevada, ya que se precisa obtener una gran cantidad de plantas transgénicas. Por tanto, se abordaron una serie de experimentos para lograr un aumento significativo de la eficacia de transformación.

Tras varias modificaciones en la metodología que previamente habíamos desarrollado en nuestro grupo, se redujo el tiempo necesario para obtener las plantas transgénicas y se aumentó la eficacia de transformación. Esto se consiguió gracias a un incremento significativo en el porcentaje de explantes capaces de iniciar la formación de callos organogénicos (con valores de entre el 70% y 80%), así como al incremento en el número de brotes transgénicos que se forman en cada explante. El uso de timentina como antibiótico para inhibir el crecimiento del *Agrobacterium* resultó ser beneficioso para la tasa de regeneración. Aparte de haber mostrado su capacidad de suprimir la proliferación de *A. tumefaciens* de forma efectiva y estable en las condiciones del cultivo *in vitro* (Cheng *et al.*, 1998), también se conocía su efecto positivo en la regeneración estimulando la organogénesis de tomate (Costa *et al.*, 2000; Mamidala y Nanna, 2009). El cambio en la composición del medio organogénico, fundamentalmente las hormonas vegetales, no sólo permitió acortar el tiempo necesario para la regeneración de brotes, sino también incrementar el número de zonas organogénicas por explante. En más de la mitad de los explantes con respuesta morfogénica (58%) se observó la formación de 5 o más brotes. El aprovechamiento de más de una zona organogénica por explante, separando estas zonas de forma temprana para garantizar que no se obtenía más de un brote transgénico por evento de transformación, también permitió aumentar la eficacia de transformación. Además de estas mejoras, la nueva metodología acortaba el tiempo de obtención de las plantas transgénicas porque se eliminó el precultivo que se utilizaba en el protocolo anterior y, gracias al nuevo medio de regeneración, fue innecesario el subcultivo de los brotes obtenidos a un medio de elongación, pudiendo subcultivarlos directamente a un medio de enraizamiento. Gracias a todos estos cambios se obtuvo un elevado número de líneas transgénicas. En concreto, se regeneraron 2586 plantas transgénicas: 1363 a partir de 816 explantes de la accesión 20164, y 1223 a partir de 1056 explantes de la accesión PE47.

En trabajos previos del grupo habíamos detectado que cierto porcentaje de las plantas regeneradas en los experimentos de transformación presentaban niveles de ploidía diferentes al material de partida. El nivel de ploidía de un organismo tiene un gran impacto sobre muchas de sus características. Por tanto, con la finalidad de evitar distorsiones en el análisis fenotípico de las líneas transgénicas obtenidas, es imprescindible eliminar las plantas que no sean diploides. Utilizando la citometría de flujo para determinar el nivel de ploidía, se identificaron un 81% y un 88% de plantas diploides en las accesiones 20164 y PE47 respectivamente. Debido a que no se estudió la frecuencia de diploides en los trabajos previos del grupo con *S. pennellii* (Gisbert *et al.*, 1999), no se puede comparar este resultado con el nuestro. Sin embargo, los valores de porcentaje de diploides regenerados son más elevados que los observados en un trabajo previo del grupo con tomate (Angarita, 2012) en el que se obtuvo un 53% de plantas diploides utilizando cotiledones como explante de partida. Nuestra hipótesis para explicar este aumento en el porcentaje de plantas diploides regeneradas es el uso de explantes de hoja en lugar de cotiledones. Mientras los cotiledones tienen un patrón polisomático mixoploide (alrededor de un 50% de sus células son tetraploides), en los explantes de hoja este porcentaje baja a un 10%.

En resumen, con la metodología anterior del grupo se obtenía un número de plantas transgénicas más que suficiente para llevar a cabo el análisis funcional de genes candidatos, ya que se obtenían colecciones de más de cien plantas transgénicas (Gisbert *et al.*, 1999). Sin embargo, las mejoras que hemos logrado nos han permitido abordar un programa de mutagénesis insercional en esta especie ya que se ha multiplicado por casi veinte veces la capacidad de generar plantas transgénicas. Además, estas plantas se obtienen en menos tiempo que antes, con la garantía de que provienen de eventos de transformación independientes y son diploides (Atarés *et al.*, 2011).

Identificación de líneas mutantes en la colección de *Solanum pennellii*

En las primeras transformaciones realizadas por nuestro grupo se utilizó la accesión 20164 debido al hecho de que ésta, al igual que PE47, presentó una elevada tolerancia al estrés salino en comparación con otras accesiones silvestres evaluadas (Bolarín *et al.*, 1991). Tras haber conseguido la colección de las plantas transgénicas mencionada anteriormente el

siguiente paso sería la obtención de la generación TG2 procedente de la autofecundación de cada una de estas líneas. Para ello, lo habitual es aclimatar las plantas TG1, cultivarlas en el invernadero y recoger los frutos para extraer las semillas. El problema es que en la mayor parte de las plantas de esta accesión no se formaban frutos, o éstos no tenían semillas en su interior. Por tanto, fue imposible llevar a cabo un escrutinio en un gran número de progenies a fin de detectar mutantes de tipo recesivo. En cambio, al disponer de las plantas TG1, se podían detectar las mutaciones de naturaleza dominante.

Mientras el tomate cultivado es una especie auto-compatible, *S. pennellii* está descrito como una especie alógama facultativa en la que, de manera excepcional, algunas accesiones son auto-compatibles o parcialmente auto-compatibles (Hardon, 1967; Rick y Tanksley, 1981; Peralta *et al.*, 2008; Bedinger *et al.*, 2011). Se han realizado estudios sobre el control genético de esta característica en la sección *Lycopersicon* y existen trabajos que describen los mecanismos de la auto-incompatibilidad (Kowyama *et al.*, 1994; Bernatzky *et al.*, 1995; Kondo *et al.*, 2007) y la aparición de los *loci* implicados durante la evolución de la sección (Richman *et al.*, 1996; Igic *et al.*, 2007). Un mecanismo fundamental de la auto-incompatibilidad es la repulsión del polen en el estilo tras la elongación del tubo polínico (Franklin-Tong y Franklin, 2003), un mecanismo controlado por diferentes alelos del locus S y dos factores adicionales ligados a este locus que tienen una función de modulación (McClure *et al.*, 1989; Hancock *et al.*, 2005; Kao y Tsukamoto, 2007). Además, se han identificado QTLs que influyen en la morfología de la flor (Bernacchi y Tanksley, 1997; Georgiady y Lord, 2002; Chen y Tanksley, 2004) y que llevaron a la clonación de *Style2.1*, un gen que controla la elongación de las células en el estilo (Chen *et al.*, 2007). También se han identificado otros QTLs que determinan la compatibilidad entre las diferentes especies del género *Lycopersicon* (Chetelat y DeVerna, 1991; Mutschler y Liedl, 1994; Moyle y Graham, 2005; Moyle y Nakazato 2010). En estudios más recientes en el género *Solanum* se comprobó que algunos de estos genes que regulan la autogamia mediante la repulsión del polen en el estigma también afectan a la compatibilidad interespecífica (Li y Chetelat, 2015; Li y Chetelat, 2014). Además, su funcionamiento no sólo es dependiente del estadio de desarrollo de la flor (Chalivendra *et al.*, 2013), sino parece que existen excepciones de esta relación mostrando diferentes niveles de compatibilidad (Baek *et al.*, 2015).

Tras comprobar que la dificultad en obtener semillas TG2 se repetía en varios ambientes, se intentó solventar este problema con la generación de nuevas colecciones de líneas T-DNA partiendo de dos accesiones diferentes de *S. pennellii*. Se utilizaron las accesiones PE47, con elevada tolerancia a estreses de tipo abiótico, y LA716, una accesión con la que se obtuvieron líneas de introgresión con tomate (Eshed y Zamir, 1995) y cuyo genoma ha sido recientemente secuenciado (Bolger *et al.*, 2014). Por lo que respecta a la eficacia de transformación, la accesión PE47 se comportó de forma similar a lo visto en la 20164. En cambio, la accesión LA716, que en principio debería mostrar menos problemas de auto-incompatibilidad, se comportó de forma diferente y únicamente se pudieron obtener unas pocas decenas de plantas transgénicas; por ello, dejamos de utilizar esta accesión en experimentos posteriores.

Además de utilizar diversas accesiones, se intentó mejorar la fructificación modificando las condiciones de cultivo de las plantas TG1. Así, se cultivaron en diferentes invernaderos y durante distintas temporadas del año, se forzó la auto-fecundación mediante polinización manual, se cultivaron las plantas con diferentes tipos de poda y entutorado, y se aumentó la humedad ambiental mediante sistemas de nebulización para simular las condiciones naturales que tienen estas accesiones en su ecosistema natural durante la época de floración (Peralta *et al.*, 2008). A pesar de todas estas medidas, no fue posible conseguir semillas de forma sistemática y reproducible a partir de la mayor parte de las plantas TG1 obtenidas. Sin embargo, se consiguió el cuajado de algunos frutos, y gracias a esto fue posible obtener algunas descendencias de varias líneas transgénicas.

De las 40 líneas que dieron más de 100 semillas TG2, solamente la mitad presentó una germinación suficientemente alta para estudiar su comportamiento en la siguiente generación. Pese al escaso número de descendencias TG2 que pudimos evaluar, se detectaron dos líneas con mutaciones recesivas interesantes. Este porcentaje de mutantes es comparable al obtenido en otros estudios similares realizados en nuestro grupo con líneas TG2 de tomate (Angarita, 2012; Goergen, 2016). Tras la constatación de la dificultad para obtener semillas TG2 en esta especie, se decidió abordar el escrutinio de las líneas T-DNA mediante la evaluación de réplicas clonales de plantas TG1. Este abordaje presenta dos inconvenientes, el primero es la distorsión fenotípica que pueden producir los cambios fisiológicos y epigenéticos presentes en las plantas TG1. Esto puede hacer que aparezca un

fenotipo aparentemente alterado en un experimento y que, al intentar corroborar este resultado, el comportamiento sea diferente al inicial. En segundo lugar, está el hecho de que no se puedan detectar mutantes recesivos. A pesar de todas estas dificultades, la evaluación de plantas TG1 ha permitido la identificación de algunos mutantes dominantes que pueden ser relevantes. Así mismo, la evaluación de las progenies TG2 que pudimos conseguir ha conducido a la detección de algunos mutantes recesivos.

5.2 Sistemas para la detección de mutantes afectados en su tolerancia a la salinidad

Como se ha comentado anteriormente, las componentes principales del estrés salino (efecto osmótico, a corto plazo, y toxicidad iónica, a medio y largo plazo) afectan a distintos mecanismos biológicos de las plantas. Evidentemente, a estos efectos principales hay que sumar el estrés oxidativo y los desequilibrios nutricionales que provoca la salinidad a medio o largo plazo. Desde nuestro punto de vista, la mejor forma de identificar plantas mutantes en aspectos relacionados con este carácter consiste en el uso de diferentes sistemas de evaluación. Esta aproximación tiene dos ventajas: la primera es que se pueden detectar mutantes cuya alteración modifica la respuesta al estrés abiótico de formas diferentes (p.ej. estados de desarrollo, órganos de la planta, duración o intensidad del estrés, etc.); en segundo lugar, cuando se detecta un posible mutante se puede estudiar su comportamiento en diferentes sistemas y comparar unos con otros (p.ej. cultivo de explantes sin raíz vs. explantes con raíz, cultivo *in vitro* vs. *in vivo*, efecto del estrés a corto plazo vs. efecto del estrés a medio o largo plazo, etc.). De esta forma, se puede profundizar en los mecanismos afectados en dicho mutante.

Después de ponderar las distintas peculiaridades que tienen los métodos *in vitro* e *in vivo* (Jain, 2001; Sakhanokho y Kelley, 2009), y al poder utilizar un número limitado de progenies TG2, se diseñaron diferentes sistemas para realizar el escrutinio a partir de plantas TG1 y se desarrollaron nuevos métodos para la evaluación de la tolerancia al estrés. En primer lugar elegimos, como explante de partida, brotes sin enraizar o plantas completas. Aunque el empleo de cultivos celulares y de callos organogénicos ha sido empleado ampliamente en trabajos previos para evaluar la tolerancia a la salinidad (Tal *et al.*, 1978; Lebrun, 1985;

McCoy, 1987; Tal, 1990; Dracup, 1991; Tal, 1994) pensamos que si se evalúan estructuras similares a una planta completa se podrán detectar alteraciones en mecanismos importantes para este carácter. Además, esto permite que la sal se aplique a las raíces, que es lo que ocurre cuando una planta cultivada se ve sometida a este estrés. Dos de estos nuevos sistemas de evaluación se basaron en el cultivo *in vitro* de ápices, sin y con raíces antes de la aplicación del tratamiento estresante. Además, para aunar las ventajas del cultivo *in vitro* (menores necesidades de espacio y mayor control de las condiciones ambientales) con las del cultivo *in vivo* (condiciones más parecidas a las que se encuentra una planta cultivada), se puso a punto un sistema adicional que combina el cultivo en un sustrato de fibra de coco y el suministro del riego por capilaridad (lo que es habitual en una evaluación *in vivo*) con el mantenimiento de las plantas en una cámara de cultivo con un elevado control de los factores ambientales (característico del cultivo *in vitro*). Si a estos sistemas les unimos los más tradicionales de cultivo de plantas a medio o largo plazo bajo condiciones de salinidad en el invernadero, el resultado es la posibilidad de evaluar las líneas T-DNA *in vitro* y en el invernadero, mediante diferentes formas y en diferentes momentos de su desarrollo. De esta manera se pudieron optimizar los recursos disponibles en el laboratorio y avanzar más rápidamente en la detección y caracterización de nuevos mutantes.

Tanto la cantidad como la forma de añadir la sal en cada uno de los sistemas de evaluación tienen un efecto considerable sobre la manifestación de alteraciones e influyen en la posibilidad de obtener resultados interesantes y fiables (Martínez-Rodríguez *et al.*, 2008; Pineda *et al.*, 2012). Al estudiar la respuesta de los testigos a diferentes concentraciones de NaCl, decidimos utilizar una concentración que provocase alteraciones visibles en el crecimiento sin causar efectos dramáticos. Por otra parte, optamos por no incrementar la concentración de sal de forma gradual, sino aplicar la cantidad elegida de golpe para evitar procesos de adaptación (Munns, 2002).

5.2.1 El cultivo *in vitro* como herramienta para el escrutinio y evaluación de mutantes afectados en su tolerancia al estrés salino

Se han utilizado diversos métodos basados en el cultivo *in vitro* para estudiar la tolerancia a la salinidad en una amplia gama de especies (Husaini y Abdin, 2008; Rai *et al.*, 2011; Bhat *et al.*, 2013). En tomate y especies silvestres relacionadas se ha demostrado que el cultivo *in vitro* permite la evaluación de la tolerancia a la salinidad de diferentes formas (Pérez-Alfocea *et al.*, 1994; Cano *et al.*, 1996; Arrillaga *et al.*, 1998; Cano *et al.*, 1998; Rus *et al.*, 1999; Gisbert *et al.*, 2000; Mercado *et al.*, 2000). Dentro de estos trabajos destacan los experimentos de Cano y colaboradores (1998) que, por primera vez, utilizaron ápices en vez de callos como material de partida para estudiar el comportamiento del tomate y de la especie silvestre *S. pennellii* frente a un estrés salino. La evaluación de este tipo de explante ofreció la ventaja de estimar distintos parámetros relacionados con el crecimiento de las raíces y los órganos aéreos. Aunque en esta tesis se ha utilizado el mismo tipo de explante inicial, el uso de un medio líquido es una novedad respecto a trabajos anteriores. Con esta modificación se pretendió utilizar una metodología con ventajas adicionales como una fácil extracción de las raíces para su evaluación y la posibilidad de cambiar los medios de cultivo cuando los explantes ya han enraizado.

Al disponer de pocas progenies TG2 por los problemas antes mencionados, en este trabajo hemos utilizado ápices meristemáticos de plantas TG1 como explante para la evaluación de la tolerancia a la salinidad de las líneas T-DNA. El uso de estos explantes presenta diferentes ventajas como se demostró en estudios con tomate y *S. pennellii* realizados anteriormente (Cano *et al.*, 1998; Mercado *et al.*, 2000). Primero, mediante clonación, se pueden obtener varios explantes de una misma planta y, si su desarrollo es el adecuado, estos explantes tendrán unas características similares. Esto es muy importante para garantizar la fiabilidad de los resultados que se obtengan. Por otra parte, el empleo de ápices meristemáticos permite evaluar uno de los procesos en los que más influye la presencia de estrés salino en el medio: el desarrollo y crecimiento de las raíces. Por último, el empleo de estos explantes nos permite disponer de un material en el que se van a dar los procesos de absorción, transporte y transpiración, de forma similar a como ocurre en una planta *ex vitro*. Por tanto, podremos detectar alteraciones en cualquiera de estos procesos con las ventajas que

supone el trabajar en cultivo *in vitro*. De esta forma no sólo esperábamos observar el efecto de la sal sobre diferentes órganos e interacciones entre ellos, sino también evitar ciertas críticas con respecto al valor de las observaciones realizadas *in vitro* y su extrapolación a su comportamiento *in vivo*, sobre todo cuando se trabaja con células en suspensión o callos organogénicos (Tal *et al.*, 1978; Lebrun, 1985; McCoy, 1987; Tal, 1990; Dracup, 1991; Tal, 1994; Mills, 2004).

Otro aspecto que puede afectar a los posibles resultados es la composición del medio de cultivo. Aunque la influencia del agar, empleado como gelificante, sobre el potencial osmótico se estima como relativamente baja (Minero-Amador y Stewart, 1987), su uso conlleva varias desventajas. Según George (2008) la presencia del agar puede inhibir la movilidad de iones y dar como resultado una distribución heterogénea en el medio. Por tanto, se decidió sustituir el medio gelificado por medio líquido para evitar este posible problema y asegurar la presencia de suficiente NaCl en la rizosfera durante todo el cultivo. Otra ventaja de la utilización de medio líquido frente al sólido reside en la facilidad de sustituir el medio a lo largo del ciclo de cultivo. Esta posibilidad facilitó la realización de los ensayos con una fase previa de enraizamiento, aplicando el tratamiento salino en el momento deseado cuando los brotes ya estaban enraizados.

En el escrutinio *in vitro* de brotes sin enraizar se evaluaron 491 líneas, de las cuales cincuenta y tres (11%) mostraron diferentes alteraciones: menor formación de raíces, reducción del tamaño de la parte aérea, elevada brotación lateral, aumento en la densidad de tricomas en las hojas, síntomas de clorosis y necrosis, o efectos más severos de intoxicación que provocaban el colapso de la planta. Para confirmar estas observaciones y averiguar hasta qué punto los resultados obtenidos son reproducibles o dependientes del tratamiento salino, se repitió la evaluación de estas líneas, no solo en presencia de NaCl sino también en condiciones control. En treinta y cuatro de las cincuenta y tres líneas evaluadas no se observó ninguna alteración respecto del WT. En diez líneas se observaron modificaciones distintas a las manifestadas inicialmente, y nueve líneas mostraron un comportamiento consistente con lo observado en el experimento inicial. Desde nuestro punto de vista estos resultados no rebaten la utilidad del sistema, sino indican que al trabajar con material clonado procedente de plantas TG1 los resultados pueden estar afectados por aspectos fisiológicos o epigenéticos de la línea T-DNA, por variaciones en las

condiciones ambientales (medio de cultivo, temperatura,...) y por la forma en que se obtiene el material vegetal de partida. Por tanto, hay que tratar con cautela las observaciones iniciales y hacer las corroboraciones pertinentes para alcanzar unos resultados fiables.

A partir de este resultado y teniendo en cuenta la influencia que puede tener el estado del material vegetal en el resultado final (p.ej. una manipulación deficiente puede provocar un mal enraizamiento adventicio), se diseñó una nueva forma de evaluar estas líneas incluyendo una fase de enraizamiento en ausencia del estrés salino, previa a la adición del NaCl. Esta etapa previa permitió el estudio del crecimiento radicular en condiciones salinas, un proceso diferente a la iniciación de su desarrollo que fue el objetivo en los primeros experimentos. Con este nuevo sistema (incluyendo el paso de enraizamiento en ausencia de sal) se evaluaron 292 líneas independientes, entre las cuales diecisiete (6%) exhibieron una alteración en su fenotipo. Al igual que en el experimento anterior se observaron alteraciones en el desarrollo de las raíces, el tamaño de la planta y otros síntomas de toxicidad causados por la sal. Además, apareció un nuevo fenotipo no observado hasta el momento: la floración temprana *in vitro* en tres líneas.

Para corroborar estos resultados se evaluaron brotes previamente enraizados sin sal en medio sin y con NaCl. En concreto, se evaluaron 57 líneas, las detectadas de esta forma y la mayor parte de las detectadas en el sistema de crecimiento de brotes sin enraizar. En este experimento, catorce líneas mostraron alteraciones similares a las observadas en ensayos anteriores: menor desarrollo radicular, menor crecimiento de la parte aérea de la planta, hiperhidratación, síntomas de toxicidad y la presencia de flores. El cultivo simultáneo en ausencia y presencia de la sal permitió observar si el fenotipo mutante fue causado por el estrés o era atribuible a un cambio en el desarrollo de la planta. En cuatro líneas se observaron alteraciones en ambas condiciones, indicando que se trata de mutantes del desarrollo. Ocho líneas mostraron un patrón de crecimiento parecido al testigo PE47 en ausencia de NaCl y síntomas de hipersensibilidad en presencia de sal. Como en el experimento anterior, se identificaron también líneas que estaban menos afectadas por la sal que el testigo PE47. Estas dos líneas presentaban un buen crecimiento del sistema radicular y de la parte aérea en la condición estresante. Esta ausencia de síntomas causados por la salinidad puede suponer la identificación de mutantes con mayor tolerancia.

Tras haber evaluado casi 800 líneas transgénicas independientes, observando su respuesta al estrés salino en diferentes sistemas de cultivo *in vitro*, llegamos a una serie de conclusiones con respecto a los métodos utilizados. En primer lugar, el empleo de medio líquido permite la aplicación del estrés salino en explantes previamente enraizados, lo que resulta muy complicado con el uso de medios gelificados.

En el escrutinio de brotes sin enraizar se identificaron inicialmente cincuenta y tres líneas con algún carácter alterado y en nueve de ellas (17%) se observó el mismo tipo de alteración en un experimento de confirmación. Por otra parte, en el experimento de evaluación de brotes enraizados, se detectaron diecisiete mutantes, de los cuales ocho (47%) mostraron un fenotipo similar en las posteriores corroboraciones. Los resultados indican que la utilización de brotes enraizados mejoró la reproducibilidad y por lo tanto la fiabilidad de los resultados.

5.2.2 Nuevo sistema de cultivo *in vivo* para el escrutinio y evaluación de mutantes afectados en su tolerancia a estrés salino

Existen estudios en varias especies, incluyendo *S. lycopersicum* y *S. pennellii*, que demuestran la reproducibilidad de observaciones *in vitro* en condiciones *in vivo* (Pérez-Alfocea *et al.*, 1994; Cano *et al.*, 1998; Rus *et al.*, 1999; Troncoso de Arce *et al.*, 1999; Carretero *et al.*, 2007; Arzani, 2008). A pesar de ello se ha demostrado que esta relación no siempre se manifiesta (Mercado *et al.*, 2000) y, como consecuencia, es imprescindible una comprobación de las observaciones *in vivo* para ratificar los resultados obtenidos *in vitro*. Además, estos experimentos pueden revelar mutantes adicionales o nuevas características alteradas debido a las condiciones distintas de crecimiento, optimizando de esta manera el aprovechamiento de la colección de plantas transgénicas generada.

A pesar de evitar ciertas desventajas propias de los sistemas de cultivo *in vitro*, los ensayos *in vivo* también presentan una serie de inconvenientes. La variabilidad en los factores ambientales a los que se ven sometidos las plantas evaluadas, como la temperatura, la intensidad de luz y su duración, o la humedad relativa, pueden tener importantes efectos sobre los niveles de tolerancia (Yeo *et al.*, 1990; Niu *et al.*, 2010). La variabilidad de estos

factores no sólo perjudica un análisis fenotípico robusto, sino que imposibilita la repetición de experimentos en diferentes épocas del año y dificulta la obtención de resultados consistentes y reproducibles (Foolad, 2004).

Con el fin de combinar las ventajas de ambos sistemas (p.ej. escasa variabilidad de los factores ambientales de las condiciones *in vitro* y cercanía a las condiciones de crecimiento de una planta en los ensayos *in vivo*), se diseñó un método adicional que consistía en el crecimiento de plantas en macetas individuales y cultivadas en una cámara de cultivo con las condiciones ambientales controladas. Este nuevo método nos permitió corroborar los resultados obtenidos en los experimentos *in vitro* y facilitó la evaluación de nuevas líneas con requerimientos mínimos de tiempo y espacio, y con unas condiciones ambientales perfectamente controladas.

Evaluamos con este sistema 1536 plantas de *S. pennellii* procedentes de 152 líneas T-DNA independientes. De ellas, cuarenta y ocho provenían de la selección de mutantes detectados en los escrutinios *in vitro*. En todos los casos se cultivaban plantas sin y con presencia de estrés salino. Diez de las cuarenta y ocho líneas seleccionadas exhibieron fenotipos modificados que fueron similares a los observados anteriormente *in vitro*. Además, siete de estas diez líneas mostraron un desarrollo normal cuando se cultivaron en ausencia de NaCl. Estos datos indican que los fenotipos alterados fueron provocados por el estrés salino. Por otro lado, las plantas presentaban en todos los casos un menor crecimiento que el correspondiente testigo en condiciones salinas, por lo que se consideran mutantes hipersensibles a la salinidad. En cambio, en dos líneas las alteraciones se observaban también en las plantas cultivadas sin estrés, por lo que cabe considerarlas como mutantes del desarrollo.

Esta nueva metodología se utilizó también para el escrutinio de 104 líneas de *S. pennellii* que se evaluaron por primera vez. Entre ellas, se detectaron cuatro candidatos con fenotipos alterados (4%). Dos líneas descubiertas en este ensayo se caracterizaban por una necrosis en las hojas basales resultando en una senescencia prematura. Las otras dos exhibieron hojas con bordes menos aserrados y casi lisos, y en una de ellas también se observó una reducción significativa en la densidad de tricomas.

Gracias a los buenos resultados obtenidos en la evaluación de la colección de *S. pennellii* mediante este sistema, se decidió utilizar esta misma metodología para la evaluación de progenies TG2 y TG3 de líneas T-DNA de tomate. La ventaja de la utilización de plantas TG2 consiste en la posibilidad de detectar mutaciones con un efecto recesivo que se manifiestan sólo en homocigosis. La segregación fenotípica en esta generación da información sobre el número de genes afectados y los estudios de cosegregación permiten examinar la relación entre el fenotipo observado y el T-DNA. Con este material se puede saber si la mutación está causada por la inserción de un T-DNA, en cuyo caso su clonación se podría hacer a partir de la secuencia conocida de ese ADN, o tiene otro origen. Hay que tener en cuenta que un cambio fenotípico en este contexto podría estar causado, además de por la inserción del T-DNA en un gen endógeno, por la inserción del cuerpo de vector o ADN de *Agrobacterium* (Herman *et al.*, 1990; Peterhans *et al.*, 1990; Cluster *et al.*, 1996; Tinland, 1996; Kononov *et al.*, 1997; Wolters *et al.*, 1998; Fu *et al.*, 2000; Svitashv y Somers, 2002;), por mutaciones puntuales o micro-delecciones causadas por la inserción del T-DNA (Negruk *et al.*, 1996), por mutaciones puntuales provocadas por la activación de elementos transponibles (Hirochika *et al.*, 1996) o por variaciones somaclonales causadas por el cultivo *in vitro* (Moreno, 1997). Por tanto, evaluando la relación entre el modo de herencia del fenotipo mutante y del gen marcador que porta el T-DNA se puede averiguar si un inserto de T-DNA es el responsable de la mutación observada.

En estos experimentos, no se partía de ápices meristemáticos enraizados sino de plántulas procedentes de semilla, por lo que fue necesario realizar los controles adecuados para ajustar el sistema. Para ello, se evaluaron las líneas testigo (P73 y MM) en diferentes concentraciones salinas y el mutante hipersensible a la sal 698 ETMM, ya que está perfectamente caracterizada y sirve para validar la utilidad de este sistema en la evaluación de la tolerancia a la salinidad en líneas de tomate. Se evaluaron 1608 plantas TG2 y TG3 de tomate pertenecientes a sesenta y ocho líneas transgénicas preseleccionadas. La finalidad de estos ensayos consistió en confirmar las alteraciones anteriormente observadas en el invernadero, detectar nuevas características y averiguar su relación con el estrés salino. En treinta y dos líneas no fue posible reproducir los fenotipos observados en el invernadero. Muchas de estas líneas fueron seleccionadas por mostrar cierta senescencia prematura en el invernadero y es posible que, en el nuevo sistema, el tiempo de cultivo no fuese

suficientemente largo para que se manifestase la alteración anteriormente observada. De las treinta y seis líneas que exhibieron alguna modificación, la gran mayoría presentó un fenotipo parecido al descrito en su evaluación en el invernadero. En treinta líneas, se confirmaron las alteraciones, como reducción de tamaño, clorosis, necrosis, o una senescencia prematura. Esta elevada concordancia entre los resultados obtenidos en el invernadero y el nuevo sistema demuestra, desde nuestro punto de vista, su utilidad para este propósito.

El cultivo simultáneo en presencia y ausencia de la sal reveló en seis líneas de tomate una clara implicación del estrés aplicado en la manifestación del fenotipo alterado. Mientras cinco de estas líneas mostraron una elevada sensibilidad en comparación con los testigos, una destacó por no presentar los síntomas típicos de una planta de tomate sometida a estrés salino. En cambio, las plantas sometidas a estrés crecían prácticamente igual que las plantas crecidas en condiciones control, es decir, sin sal añadida. Por su elevado interés y la reproducibilidad de los resultados en varios experimentos, nuestro grupo continuará con la caracterización de estas líneas a fin de identificar nuevos mecanismos y genes involucrados en la respuesta a la salinidad.

En comparación con otros métodos de evaluación, el sistema hidropónico presenta una serie de características particulares. Si se compara con los ensayos en cultivo *in vitro*, existe una clara diferencia en cuanto a la humedad relativa en la atmósfera, mucho menor en el sistema hidropónico, y en un crecimiento más parecido al de una planta cultivada, ya que no se añadía azúcar ni reguladores del crecimiento a la solución de riego. Por otra parte, aunque este sistema resulta más laborioso que los experimentos de cultivo *in vitro*, el manejo y control requieren menos recursos que un escrutinio en el invernadero. Por todo ello, desde nuestro punto de vista, el sistema hidropónico, demostró su utilidad para el escrutinio de líneas T-DNA en ambas especies. Con los experimentos con *S. pennellii* se comprobó la reproducibilidad de los fenotipos observados en cultivo *in vitro* en el 21% de las líneas evaluadas *in vivo*. Además se detectaron nuevos mutantes con fenotipos distintos a los observados *in vitro*, lo cual confirmó nuestra hipótesis sobre la necesidad de evaluar una colección de plantas transgénicas mediante diferentes métodos. En el 44% de las líneas evaluadas de tomate se observó un fenotipo similar al visto en el invernadero. Una gran ventaja del método desarrollado en esta tesis consiste en la posibilidad de detectar

alteraciones en estadios muy tempranos, como por ejemplo en el desarrollo de los cotiledones, un hecho que complementó la descripción fenotípica de diversas líneas de tomate. También, hay que resaltar que, aunque las evaluaciones se hacen a corto plazo, algunas de las plantas evaluadas se transfirieron al invernadero para completar su fenotipado en etapas posteriores del desarrollo y obtener las descendencias deseadas.

A modo de resumen de este apartado, con los diversos sistemas de evaluación se han analizado unas 900 líneas transgénicas de *S. pennellii* y *S. lycopersicum*. Para ello ha sido necesario el manejo de más de 8.000 plantas. Aunque el sistema de cultivo hidropónico presenta unas características novedosas respecto de los métodos previos, los tres métodos utilizados cumplen una función para el estudio de mecanismos específicos relacionados con la tolerancia a la salinidad, pero su verdadero potencial reside en su naturaleza complementaria y la posibilidad de combinarlos con otros métodos ya existentes.

5.3 Implicaciones de las alteraciones observadas en la tolerancia a la salinidad

Tras haber demostrado la utilidad de los sistemas desarrollados para el escrutinio de una colección de plantas transgénicas, vamos a revisar hasta qué punto algunas de las alteraciones fenotípicas pueden estar relacionadas con los mecanismos de tolerancia al estrés salino.

De forma similar a lo que se ha descrito en trabajos con otras especies (Munns, 2002; Cominelli et al., 2013; Roy et al., 2014), algunos de los mutantes que hemos detectado tras el escrutinio en condiciones salinas exhiben alteraciones en el crecimiento de las raíces y el desarrollo de la parte aérea. Sin embargo, se han detectado otras alteraciones fenotípicas como la floración temprana, la acumulación de antocianinas o la hiperhidratación, que también son interesantes.

5.3.1 Efectos de la salinidad sobre el desarrollo de los órganos vegetativo aéreos

Según varios estudios en tomate, el impacto del estrés salino sobre el desarrollo de los órganos aéreos es más grave y persistente que sobre las raíces, convirtiéndolo, según algunos autores, en una medida fiable para evaluar el nivel de tolerancia (Salim, 1989; Cruz *et al.*, 1990; Pérez-Alfocea *et al.*, 1993). Una vez absorbido por la planta, el NaCl puede tener una amplia gama de efectos negativos. Por un lado, el aumento de iones salinos resulta en una reducción del crecimiento vegetativo (Sharp, 1988; Munns, 2002; Abed Alrahman, 2005; Shibli *et al.*, 2007), lo cual tiene su origen tanto en una disminución de la división como de la expansión celular (Ali *et al.*, 1994). Esto se manifiesta en un menor crecimiento del tallo (Cruz *et al.*, 1990), un retraso en la formación de hojas y una reducción de la superficie foliar con la finalidad de reducir la transpiración (Osorio, 1998; Blum, 1996; Albacete, 2008). El mismo objetivo tiene el cierre de los estomas, una respuesta a la sal provocada por el ácido abscísico que se sintetiza en las raíces (Schachtmann, 2008; Chaves, 2009). Por otro lado, el estrés salino suele afectar a los órganos ya desarrollados. Aunque existen trabajos en los que se describe un incremento de la clorofila en presencia de sal (Wang y Nil, 2000), algo que se observó también en los experimentos con tomate aplicando concentraciones bajas de cloruro sódico (Romero-Aranda *et al.*, 2001), la manifestación de síntomas de clorosis es la consecuencia prevalente del efecto tóxico causado por la acumulación de Na⁺ en las hojas (Khavarinejad y Mostofi, 1998; Parida y Das, 2005; Ghanem *et al.*, 2008; Orellana *et al.*, 2010). Si la planta es incapaz de adaptarse a estas condiciones, el estrés oxidativo, como consecuencia del aumento de especies reactivas de oxígeno en las células, ocasiona la necrosis y senescencia de las hojas (Munns, 2002; Sánchez-Bel *et al.*, 2012). Estos síntomas suelen manifestarse primero en la parte inferior debido a la capacidad de dirigir el flujo de iones de forma diferencial entre hojas jóvenes y adultas (Maggio *et al.*, 2007). Si estas respuestas no son suficientes para controlar la homeostasis iónica, el desajuste provoca el colapso y la muerte de la planta.

Gracias a cambios observados en estos caracteres se han podido identificar varios mutantes que han permitido profundizar en los mecanismos biológicos implicados en la tolerancia a la salinidad en tomate. En nuestro grupo se han identificado varios mutantes afectados en la respuesta al estrés salino con alteraciones en el desarrollo de la parte aérea de la planta. Por

ejemplo, la línea 698 ET73, que exhibe mayor clorosis foliar y síntomas de hiperhidratación *in vitro*, y el mutante *pms* (*protecting meristems against salinity*), que se caracteriza por la una inhibición del desarrollo de la parte aérea (Egea *et al.*, 2014; Sánchez, 2016). Además, partiendo del estudio de otro mutante fue posible clonar el gen *ARS1* (*ALTERED RESPONSE TO SALINITY1*) (Campos *et al.*, 2015). Este mutante presentaba síntomas de clorosis, necrosis y la senescencia prematura de las hojas tras la aplicación de estrés salino *in vivo*. A nivel fisiológico se descubrió una elevada concentración de Na⁺ en las hojas. Esta acumulación fue causada por una alteración en el cierre de los estomas, lo que aumentaba la transpiración. El análisis comparativo de la proteína *ARS1* indicó una elevada similitud con miembros de la familia MYB, factores de transcripción que participan en respuestas a diferentes estreses abióticos (Campos *et al.*, 2015).

5.3.2 Efecto de la salinidad sobre el sistema radicular

Las raíces, que están en contacto directo con el sustrato o la solución nutritiva de cultivo, regulan la absorción de agua e iones y forman de esta manera la barrera permeable entre el entorno y las condiciones interiores de la planta. Su reacción adecuada al estrés salino o hídrico es esencial para mantener las funciones vitales en condiciones adversas y, debido a esta función, la detección de mutantes alterados en el desarrollo radicular y la comprensión de los procesos relacionados pueden ayudar a mejorar la tolerancia. Aunque se ha descrito que la detención del desarrollo de las raíces al verse sometidas a estrés salino parece tener un efecto transitorio y reversible (Rodríguez *et al.*, 1997), el crecimiento de las raíces de tomate suele ser muy sensible a aplicaciones de sal y por lo tanto es un carácter válido para evaluar la tolerancia de esta especie (Bourgeais-Chaillou y Guerrier, 1992; Mercado *et al.*, 2000; Shibli *et al.*, 2007). Adicionalmente a esta observación, Cano y colaboradores (1998) mostraron que la elevada tolerancia de *S. pennellii* en comparación con el tomate cultivado se refleja también en la repuesta del sistema radicular al estrés salino y que por eso puede servir como buen indicador en esta especie silvestre.

El descubrimiento de varios genes relacionados con la tolerancia al estrés salino a partir de observaciones *in vitro* relacionadas con alteraciones en el crecimiento radicular demuestra que el desarrollo radicular es un buen indicador para cambios en los mecanismos de

tolerancia. Por ejemplo, los genes *SOS*, que tienen funciones esenciales en la homeostasis de iones y en la respuesta al estrés salino, se identificaron mediante observaciones del desarrollo de las raíces después de una aplicación de NaCl (*SOS1*: Wu *et al.*, 1996; *SOS2*, Zhu *et al.*, 1998; *SOS3*: Liu y Zhu, 1997; *SOS4*: Shi *et al.*, 2002; *SOS5*: Shi *et al.*, 2003). El gen *HKT1*, que regula la absorción de Na⁺ por la raíz, se descubrió también utilizando esta aproximación (Rus *et al.*, 2001). De la misma manera, Borsani y colaboradores (2001) identificaron dos loci involucrados en la tolerancia a la salinidad en tomate (*tss1* y *tss2*), demostrando así que el desarrollo radicular está estrechamente relacionado con la tolerancia de una planta frente al estrés salino.

La posibilidad de evaluar *in vitro* el efecto de la sal sobre materiales sin o con raíces y realizar cambios de medios sin dañar el sistema radicular ofrece grandes oportunidades para observar fácilmente la reacción del órgano más relevante en la respuesta a la salinidad, evaluar su implicación en la absorción de los iones y examinar el efecto de la sal sobre los órganos aéreos en ausencia de esta barrera.

5.3.3 Floración temprana

En términos generales, algunas condiciones adversas para la planta pueden resultar en una aceleración del ciclo de vida para asegurar el desarrollo de la fase reproductiva (de Jong y Leyser, 2012; Takeno, 2012). En el tomate se ha demostrado que el momento de floración puede ser alterado por ciertas circunstancias como temperaturas bajas, días cortos, la intensidad de la fuente de iluminación, disponibilidad de nutrientes y el estrés salino (Dielen *et al.*, 2004; Quinet *et al.*, 2006; Samach y Lotan, 2007; Ghanem *et al.*, 2009). El estrés salino está descrito en diferentes especies como inductor de adelanto de la floración (Liu *et al.*, 1989; Mercado *et al.*, 2000; Munns y Tester, 2008), pero también como un factor que la retrasa (Hayward y Long, 1943; Dumbroff y Cooper, 1974; Maas y Poss, 1989; Lutts *et al.*, 1995; Achard *et al.*, 2006; Ghanem *et al.*, 2009; Ryu *et al.*, 2011; Ryu *et al.*, 2014; Kazan y Lyons, 2015). En tomate el tipo de respuesta parece depender de la intensidad del estrés aplicado y del genotipo evaluado. Concentraciones altas resultan en un retraso de la floración (Hayward y Long, 1943; Dumbroff *et al.*, 1974; Ghanem *et al.*, 2009), mientras que un estrés moderado ocasiona una cierta antelación (Liu *et al.*, 1989; Mercado *et al.*, 2000). Al

evaluar la respuesta de dos cultivares de tomate sometidos a un tratamiento salino, Mercado y colaboradores (2000) observaron que sólo uno respondía con floración temprana, mientras que el segundo no mostró ninguna alteración en este carácter.

Aparte de que no se conocen los mecanismos que pueden favorecer una floración adelantada en condiciones salinas, este tipo de alteración parece ocurrir con una frecuencia muy baja. Evaluando una colección de 13.000 líneas mutagenizadas de tomate para una serie de propiedades *in vivo*, Menda *et al.* (2004) observaron que sólo cuatro de las 41 líneas afectadas en la floración exhibieron una antelación mientras las otras manifestaron un retraso. Los mecanismos que pueden resultar en un adelanto de floración en condiciones salinas son desconocidos, pero se conocen varios factores que la retrasan. El gen *GIGANTEA* (*GI*) controla la floración en *Arabidopsis* (Yoo *et al.*, 2005; Fornara *et al.*, 2007; Mishra y Panigrahi, 2015) y responde a diferentes estreses abióticos entre los que se encuentra la salinidad (Kurepa *et al.*, 1998; Cao *et al.*, 2005). Se ha demostrado que el estrés salino da como resultado una degradación de giberelinas causando un retraso de floración (Kawasaki *et al.*, 2001; Kim *et al.*, 2013; Park *et al.*, 2013). También se observó un efecto negativo de la sal sobre otros genes que participan en la regulación de la floración. Así, la reducción en la expresión de *CONSTANS* (*CO*), *LEAFY* (*LFY*) y *FLOWERING LOCUS T* (*FT*) prolongó la fase vegetativa y retrasó la transición a la floración (Achard *et al.*, 2006; Kim *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2007). Aparte de estos genes que promueven la floración, también se conocen otros que inhiben la floración y que están afectados por el estrés salino. Un ejemplo de este tipo de genes es *BROTHER OF FT AND TFL1* (*BFT*), que en presencia de un estrés salino retrasa la formación de flores (Ryu *et al.*, 2014; Kazan *et al.*, 2015). En base a un mutante *knock-out* de *BFT* (*bft-2*) que no exhibió un retraso de floración en presencia de sal, Ryu y colaboradores (2011) revelaron un mecanismo adicional en este proceso. Otro inhibidor de la floración es el gen *FLOWERING LOCUS C* (*FLC*). Diversos autores han demostrado la existencia de un efecto indirecto del NaCl sobre su expresión (Streitner *et al.*, 2008; Lorkovic, 2009). Recientemente se ha descubierto que una quinasa dependiente de ciclina, una clase de enzimas que participa en la regulación del ciclo celular y la determinación de las células en los órganos, también tiene una función en la regulación transcripcional de genes activados por el estrés salino (Wang *et al.*, 2004). La pérdida de función del gen *CYCLIN-DEPENDENT KINASE G2* (*CDKG2*) tuvo como consecuencia una aceleración de la floración, regulando de una manera

desconocida la expresión de *FLC*, y una reducción de los síntomas negativos del tratamiento salino durante la germinación y el crecimiento (Ma *et al.*, 2015).

En este contexto resulta muy interesante no sólo haber identificado varias líneas con una antelación de la floración, sino que algunas de ellas muestren esta alteración como respuesta al estrés salino.

5.3.4 Producción de antocianinas

Las antocianinas son un grupo de sustancias, derivadas de los flavonoides, al que pertenecen alrededor de 650 compuestos. La capacidad de estos pigmentos hidrosolubles para absorber diferentes longitudes de onda de la luz y reflejar otras da como resultado su propiedad de colorear los tejidos vegetales en tonalidades entre asalmonado, rojo, morado y azul oscuro, según el pH (Andersen, 2010). Aparte de su función conocida de dar color a las flores y frutos para atraer polinizadores y dispersores de semillas, las antocianinas intervienen en la defensa contra una amplia gama de estreses (Chalker-Scott, 2002; Hernández *et al.*, 2009; Kovicich *et al.*, 2015). En situaciones de carencia de agua, como ha sido el caso en la detección de la línea 5509 ETSP, las antocianinas disminuyen la evapotranspiración, tanto mediante una reducción de la conductividad de los estomas como por su función osmoreguladora que resulta en una disminución del potencial osmótico mejorando la retención del agua en las hojas (Chalker-Scott, 2002; Hughes *et al.*, 2013). Además, se ha demostrado que las antocianinas retrasan la senescencia de las hojas y que eso puede reducir los daños causados por sequía (Rivero *et al.*, 2007; Landi *et al.*, 2015). Otro aspecto relevante en relación con los estreses abióticos es el efecto anti-oxidativo de estos compuestos. Una de las consecuencias perjudiciales del estrés osmótico consiste en la formación de especies de oxígeno reactivo en los cloroplastos, lo que representa un peligro para la estructura y el funcionamiento de las células (Vickers *et al.*, 2009; Sharma *et al.*, 2012). Se ha demostrado tanto *in vitro* (Neill y Gould, 2003; Juadjur *et al.*, 2015) como *in vivo* (Gould *et al.*, 2002; Zhang *et al.*, 2012; Nakabayashi *et al.*, 2014) que las antocianinas reducen el contenido de diferentes especies de oxígeno reactivo, mejorando de esta manera la tolerancia a la sequía y a la salinidad (Eryilamz, 2006; Sperdouli y Moustakas, 2012). Se sabe desde hace tiempo que la defensa contra el estrés salino de *S. pennellii* es más efectiva

que la de las especies cultivadas, gracias en parte a su sistema anti-oxidativo más eficiente (Mittova *et al.*, 2002). Frary y colaboradores (2010) mostraron recientemente que la tolerancia a la salinidad se basa también en el aumento de flavonoides, el grupo al que pertenecen las antocianinas.

Aparte de la posibilidad de identificar genes que regulen la síntesis de antocianinas, la detección de un mutante afectado en la metabolización de estos compuestos en presencia de un estrés específico (en concreto, estrés hídrico) puede revelar mecanismos involucrados en la respuesta al estrés abiótico. Un ejemplo que ilustra el comentario anterior es la identificación del gen *AIR1* (*ANTHOCYANIN-IMPAIRED-RESPONSE 1*) en *Arabidopsis*. Entre otras propiedades, el mutante *sos3-1* de *A. thaliana* se caracteriza por una acumulación de antocianinas en presencia de sal. En un escrutinio de mutaciones secundarias inducidas por T-DNA en el fondo genético de *sos3-1*, se identificó una mutación secundaria que suprimió la formación de antocianinas e inhibió esta respuesta específica al estrés salino. A continuación se demostró que el gen alterado, *AIR1*, es un factor de transcripción que se activa exclusivamente en condiciones salinas, regula la expresión de genes de la ruta de síntesis de las antocianinas e influye la tolerancia a estrés oxidativo (Van Oosten *et al.*, 2013).

5.3.5 Hiperhidratación

Las características especiales del cultivo *in vitro* pueden resultar en una serie de alteraciones fisiológicas en el desarrollo de las plantas que se incluyen bajo el término hiperhidratación. El elevado contenido en agua, azúcares y la presencia de reguladores de crecimiento en los medios utilizados para el cultivo *in vitro* pueden afectar el desarrollo de la planta. Además, la composición de la atmosfera dentro de los recipientes puede generar diversas alteraciones (Bairu y Kane, 2011; Ruffoni y Savona, 2013). Aparte de la elevada humedad relativa que reduce la transpiración (Ziv, 1991), el contenido alterado de varios gases relevantes para el crecimiento vegetal como el etileno, dióxido de carbono y oxígeno (Jackson *et al.*, 1991; Buddendorf-Joosten y Woltering, 1994) puede tener efectos severos sobre el desarrollo de los órganos aéreos. Un factor principal de la hiperhidratación parece ser la excesiva acumulación de agua en el apoplasto, lo que conduce a un engrosamiento de tallos y hojas que da como resultado el aspecto cristalino o vitrificado de los tejidos típico de las plantas

hiperhidratadas (Debergh *et al.*, 1992). Este exceso de agua en los tejidos vegetales afecta el estado fisiológico de la planta de forma similar a como lo hacen otros estreses abióticos, inhibiendo el intercambio de gases y provocando un estrés oxidativo debido a la acumulación de especies reactivas de oxígeno (Rojas-Martínez *et al.*, 2010; Van den Dries *et al.*, 2013). Otros procesos biológicos que se ven alterados por la hiperhidratación son el funcionamiento de los estomas, la formación de paredes celulares y haces vasculares, la síntesis de lignina, polifenoles y la cera de la cutícula que afectan el transporte de agua e iones (Hazarika, 2006).

En un escrutinio de una colección de líneas transgénicas, la detección de mutantes con fenotipos de hiperhidratación puede abrir nuevas posibilidades para el estudio de procesos relacionados con la tolerancia a estreses abióticos. Un ejemplo sobre la posible relevancia de mutantes con síntomas de hiperhidratación para detectar mutantes sensibles a la salinidad es la línea *sog-698* (698 ETMM) de tomate. Este mutante se identificó en nuestro grupo de trabajo en un escrutinio de plántulas expuestas a estrés salino *in vitro* y sirvió para calibrar el sistema de capilaridad (Garrido, 2009). En estudios más exhaustivos del mutante *in vivo* se comprobó que acumula significativamente más agua en los folíolos que el WT. En condiciones salinas, este elevado transporte causa una mayor tasa de transpiración y conductancia estomática resultando en la acumulación de Na⁺ en las hojas, donde se observa la manifestación de una clorosis a los pocos días del inicio del tratamiento salino (Pineda *et al.*, 2011; Egea *et al.*, 2014).

Se ha descrito que plantas de *S. pennellii* cultivadas *in vitro* no muestran un patrón de crecimiento diferente en comparación con plantas cultivadas *in vivo*, que su respuesta a un estrés salino es similar en ambas condiciones y que no exhiben una elevada susceptibilidad para la hiperhidratación (Cano *et al.*, 1998; Mills, 2004). En esta tesis, se identificaron dos líneas con severos síntomas de hiperhidratación por lo que su manifestación puede indicar una alteración en un mecanismo relacionado con la absorción de agua o iones.

5.4 Los mutantes más relevantes

Uno de los objetivos centrales de esta tesis es la identificación de mutantes alterados en la tolerancia a la salinidad. La imposibilidad de obtener progenies TG2 de *S. pennellii* nos ha impedido realizar el análisis de las descendencias para la mayoría de las líneas transgénicas generadas. Por lo tanto, en muchas de estas líneas no se ha podido confirmar que las alteraciones identificadas en el escrutinio de la TG1 tienen su origen en una mutación génica, estudiar el modo de herencia y la existencia de cosegregación entre el fenotipo mutante y un inserto de T-DNA. Pese a todas estas dificultades se han identificado tres mutantes de *S. pennellii* que tienen un gran interés. La línea 4196 ETSP, un mutante dominante, presenta un fenotipo en la TG1 excepcional o insólito. El mutante 4166 ETSP, que se identificó en una de las pocas TG2 evaluadas, exhibe alteraciones en su desarrollo vegetativo, en concreto en la ramificación axilar. Por otra parte, la línea 4025 ETSP, que presenta graves alteraciones en su desarrollo radicular embrionario y adventicio, exhibe un fenotipo apropiado para estudiar las fases iniciales del desarrollo radicular. Dentro de los materiales pre-seleccionadas de tomate destacó la línea 901 ET73 con su fenotipo afectado en el desarrollo radicular y el posible interés que pueden tener estas alteraciones para entender la regulación del crecimiento de este órgano tan importante para la tolerancia a estreses abióticos como la salinidad o sequía.

5.4.1 901 ET73

Para aprovechar el desarrollo de nuevos métodos de evaluación de la tolerancia a la salinidad, se decidió llevar a cabo un objetivo adicional que consistía en el estudio de algunas líneas de tomate preseleccionadas por haber mostrado algún fenotipo interesante en la TG2. De estos ensayos, cabe resaltar los resultados obtenidos con la línea 901 ET73.

La línea 901 ET73 tiene un gran interés porque, aunque el fenotipo mutante se muestra en ausencia de estrés, sus alteraciones afectan, entre otros órganos de la planta, a uno tan relevante para la respuesta a estrés hídrico o salino como es la raíz. La dificultad para formar raíces se observa tanto *in vivo* como *in vitro*. Según el sistema de riego, la reducción de raíces en el mutante tenía un efecto más o menos severo sobre el crecimiento de los

órganos aéreos. Cuando las plantas se cultivaron con riego por goteo, crecieron, aunque algo menos que el testigo, y llegaron a florecer y dar frutos sin problemas. En cambio, cuando el cultivo se hizo en macetas regadas manualmente cada varios días se observó el colapso del tallo principal a partir de cierta longitud y las plantas no llegaron a florecer. Cuando estas últimas se pasaron a un sistema de riego por goteo fueron capaces de recuperarse parcialmente y desarrollar tallos de mayor longitud. Los primeros síntomas que se observaron en la parte aérea fueron el colapso de la parte apical de los tallos por el marchitamiento del meristemo y de las hojas más jóvenes. Como consecuencia del colapso del meristemo apical, se observó la brotación axilar de yemas de las zonas inferiores de la planta. En definitiva, pensamos que la mutación de la línea 901 ET73 afecta al crecimiento radicular y tiene como consecuencia alteraciones adicionales como una reducción de tamaño, la falta de turgencia en las hojas o el colapso de los meristemos apicales.

Aparte de ser la entrada principal de agua y nutrientes, la raíz da soporte, convirtiendo a las plantas en organismos sésiles (Jones y Ljung, 2012). Esta inmovilidad provoca la necesidad de adaptarse continuamente a las condiciones presentes en su hábitat y modificar su desarrollo según los cambios en su entorno (Wolters y Jürgens, 2009). Dentro de estos factores ambientales, los estreses bióticos y abióticos requieren la incorporación de señales externas en la programación del crecimiento para asegurar una respuesta adecuada por su potencial amenaza para la supervivencia (Fujita *et al.*, 2006; Bacaccia, 2010). Esta aptitud de adaptarse y responder de forma flexible a diversos estímulos, denominada plasticidad, se manifiesta a nivel bioquímico, fisiológico y morfológico, y tiene que mantener un balance ajustado entre la respuesta al estrés y su repercusión sobre el crecimiento (Peleg y Blumwald, 2011; De Jong y Leyser, 2012; Lawlor, 2013; Fahad *et al.*, 2015). Las primeras observaciones relacionadas con esta característica se hicieron hace más de 100 años, cuando Cannon (1911) describió que las plantas del desierto pueden modificar la arquitectura de sus raíces en función de la disponibilidad de agua. Debido a la importancia y la complejidad de una respuesta adecuada a los factores ambientales, los procesos involucrados en el desarrollo y las respuestas a los diversos estreses están estrechamente vinculados y muchas veces controlados por los mismos genes (Claeys y Inzé, 2013). Por lo tanto y con la finalidad de mejorar la productividad de los cultivos en condiciones adversas, uno de los retos científicos y agronómicos más relevantes en la actualidad consiste en la comprensión de los

nexos que existen entre desarrollo radicular y tolerancia a estrés (Hirayama y Shinozaki, 2010; Iyer-Pascuzzi *et al.*, 2011; Wachsmann *et al.*, 2015). La importancia que tiene la arquitectura de la raíz para la adaptación a condiciones desfavorables convierte a los genes involucrados en el desarrollo radicular en objetivos de alto interés para incrementar la tolerancia a los estreses abióticos (de Dorlodot *et al.*, 2007).

Debido a los pocos genes identificados en el tomate que regulan el desarrollo de sus raíces, es necesaria la revisión en otras especies para ver qué genes pueden estar afectados en el caso presente. En *Arabidopsis* se han identificado varios genes que modulan el desarrollo de las raíces (Scheres *et al.*, 2002; Cuesta *et al.*, 2013). Se han descubierto diversos factores de transcripción que afectan la arquitectura de la raíz, como *SCARECROW (SCR)* y *SHORTROOT (SHT)*, que regulan la división celular así como la renovación y distribución de células madre (Di Laurenzio *et al.*, 1996; Hellariutta *et al.*, 2000), y *BREVIS RADIX (BRX)*, que controla la proliferación y elongación de células en la zona de crecimiento del ápice radicular (Mouchel *et al.*, 2004). Recientemente se ha demostrado que el ortólogo de maíz del gen *LATERAL ROOT PRIMORDIA 1 (LRP1)* de *Arabidopsis* interactúa con genes de la familia Aux/IAA (Smith y Fedoroff, 1995; Zhang *et al.*, 2015). La incapacidad de transportar, recibir o procesar la señalización de auxinas suele resultar en un crecimiento reducido del sistema radicular, algo que se observó en el mutante 901 ET73. Asimismo, mutantes como *auxin resistant4 (axr4)*, *transport inhibitor response1 (tir1)* o los afectados en el gen *AUXIN INFLUX CARRIER 1 (AUX1)* se caracterizan por raíces menos desarrolladas (Hobbie y Estelle, 1995; Bennett *et al.*, 1996; Ruegger *et al.*, 1998; Gray *et al.*, 1999). Los mutantes *sas1 (sodium overaccumulation in shoot)* y *shs1 (sodium hypersensitive 1)* de *Arabidopsis* presentan un crecimiento reducido de las raíces en ausencia de sal (Nublat *et al.*, 2001; Inan *et al.*, 2007). En presencia de sal, *shs1* respondió con un desarrollo de las raíces todavía más disminuido, la acumulación de antocianinas y síntomas de clorosis (Inan *et al.*, 2007). Cultivado en un medio suplementado con sal, el mutante *sas1* se caracteriza por una elevada acumulación de sodio en el tallo, consecuencia de una elevada absorción por las raíces del NaCl presente en el medio de cultivo (Nublat *et al.*, 2001).

Además de estos ejemplos, que se caracterizan por un desarrollo radicular reducido, existen otros que presentan un crecimiento incrementado. Aparte de ayudar a entender las características del mutante que hemos identificado, estos materiales pueden servir para

demostrar la ventaja de un sistema radicular bien desarrollado en condiciones adversas. En una colección de plantas transgénicas de *Arabidopsis* obtenidas mediante el sistema de activación transcripcional (*activation tagging*), Karaba y colaboradores (2007) identificaron un mutante de ganancia de función. El gen alterado, *hardy (hrd-D)*, pertenece a la familia de factores de transcripción AP2/ERF cuyos miembros intervienen en la respuesta a diferentes estreses bióticos y abióticos (Gutterson y Teuber, 2004; Mizoi *et al.*, 2012). La mutación *hrd-D*, que provoca un mayor desarrollo del sistema radicular, resultó en una elevada tolerancia tanto a sequía como al estrés salino (Karaba *et al.*, 2007). Como consecuencia de una síntesis aumentada de la auxina IAA, *rooty (rty)* y las mutaciones alélicas *superroot1 (sur1)* y *aberrant lateral root formation1 (alf1-1)* aumentan la cantidad de raíces secundarias y pelos radiculares mejorando de esta manera la superficie de absorción de agua y nutrientes (Boerjan *et al.*, 1995; Celenza *et al.*, 1995; King *et al.*, 1995).

Un caso más reciente para demostrar la relación íntima entre el desarrollo y la tolerancia al estrés salino es el mutante *res (restored cell structure by salinity)* que los grupos participantes en el proyecto en el que se enmarca la presente tesis identificaron en una colección de plantas de tomates transformadas con la trampa de intensificadores (García-Abellán *et al.*, 2015). En ausencia de sal las plantas mutantes se caracterizan por un crecimiento reducido y síntomas de clorosis y necrosis en la parte aérea y una reducción de la longitud y del número de raíces laterales. Estudios fisiológicos revelaron un elevado nivel del ácido jasmónico en las raíces como causante del fenotipo. Sorprendentemente, la aplicación de un estrés salino a plantas cultivadas *in vitro* e *in vivo* causó la desaparición de las alteraciones en las raíces y hojas, y resultó en la restauración de la estructura celular que fue la base de las modificaciones observadas. En definitiva, en nuestra opinión, la identificación de los genes responsables y el entendimiento de todos estos mecanismos pueden contribuir a una futura mejora de las plantas frente a estreses, como la sequía y la salinidad, a los que se ve sometida la raíz habitualmente.

5.4.2 4196 ETSP

Las plantas de la línea 4196 se caracterizan por un pronunciado retraso en el crecimiento, una elevada compacidad debido a entrenudos más cortos y hojas con una morfología diferente, cuyos limbos están totalmente arrugados. También se observaron alteraciones en los órganos reproductivos que pararon su desarrollo en una fase equivalente a la pre-antesis en plantas silvestres y que imposibilitaron la obtención de descendencia del mutante. Con estas características, el fenotipo de la línea 4196 ETSP presenta una cierta similitud con los mutantes de tomate *Dwarf (D)* (Bishop *et al.*, 1996), *dumpy (dmp)* (Koka *et al.*, 2000) o *curl-3 (cu-3)* (Holton *et al.*, 2007). Estos tres mutantes se caracterizan por tener alterado el metabolismo de los brasinoesteroides, un grupo de compuestos con funciones de hormonas vegetales, por lo que es posible que el mutante 4196 ETSP esté alterado también en un proceso relacionado, aunque será necesaria la realización de algún experimento adicional para comprobar esta cuestión.

El descubrimiento de que un grupo de esteroides actúa como hormonas vegetales empezó con la observación de que aplicaciones de extractos de polen tenían un efecto positivo sobre el crecimiento de la planta (revisado por Clouse, 2015). Se descubrió entonces que estos compuestos, con su estructura química de tipo esteroideal, forman parte de los brasinoesteroides, un grupo omnipresente en el reino vegetal (Divi *et al.*, 2009) y a la vez singular por ser los únicos esteroides con las funciones esenciales de una hormona vegetal (Sun *et al.*, 2005). Partiendo de la brasinólida, se han identificado dos rutas de síntesis interrelacionadas, numerosas funciones y alrededor de 70 sustancias con efectos similares, entre ellas precursores como la catasterona (Yokota *et al.*, 1982; Fujioka y Yokota, 2003; Vriet *et al.*, 2012; Singh y Salvaldi-Goldstein, 2015).

La modulación de la frecuencia mitótica, la regulación del transporte de agua hacia las células en fase de expansión y un incremento en la extensibilidad de las paredes celulares son conocidos puntos de intervención de los brasinoesteroides para facilitar el crecimiento (Wang *et al.*, 1993; Bajguz, 2000; Morillon *et al.*, 2001; Friedrichsen y Chory, 2001). Otros mecanismos en los que intervienen los brasinoesteroides son la germinación, la diferenciación vascular, la fotomorfogénesis, el cierre de estomas, procesos de senescencia y el desarrollo reproductivo (Chory *et al.*, 1991; Bishop y Yokota, 2001; Montoya *et al.*, 2002;

Haubrick y Assmann, 2006). Los mutantes con pérdida de función en la metabolización, señalización o percepción de los brasinoesteroides tienen un fenotipo compacto, con un crecimiento lento y hojas arrugadas (Azpiroz *et al.*, 1998). Además, la interacción de los brasinoesteroides con otras hormonas vegetales ilustra la importancia de estos compuestos en el control de una amplia gama de procesos (Divi *et al.*, 2010; Domagalska *et al.*, 2010; Gruszka, 2013).

En experimentos posteriores a esta tesis se ha demostrado que la aplicación externa de 24-epibrasinolide a la línea 4196 ETSP no da como resultado la restauración del fenotipo WT, como sí ocurre con alguno de los mutantes identificados en tomate. Por lo tanto, pensamos que la mutación no está afectando a un gen relacionado con la síntesis de esta hormona, sino a uno involucrado en el proceso de detección y/o señalización. El primer gen identificado que participa en la percepción de las señales transmitidas por los brasinoesteroides fue *BRASSINOSTEROID INSENSITIVE 1 (BRI1)* (Clouse *et al.*, 1996). Su clonación se consiguió en 1997 por Li y Chory, y permitió la identificación de homólogos en una amplia gama de especies (Clouse, 2015). La clonación de la versión original del gen *CURL3* del tomate, que proviene de una mutación espontánea en un lote de semilla de *S. pimpinellifolium* y fue introducido mediante cruces inter-específicos en la especie cultivada, reveló que es un homólogo de *BRI1* (Yu, 1982; Koka *et al.*, 2000; Montoya *et al.*, 2002). *BRI1* codifica una quinasa que percibe los brasinoesteroides en la superficie de las células y transmite las señales al núcleo donde otros factores de transcripción activan los genes controlados por los brasinoesteroides (Clouse, 2011).

Aparte de su participación en procesos de desarrollo, hay varias funciones de los brasinoesteroides que afectan a la tolerancia a estrés biótico y abiótico (Divi y Krishna, 2009; Ashraf *et al.*, 2010; Sirhindi, 2013). Mediante su aplicación externa se descubrieron consecuencias positivas sobre la tolerancia a temperaturas extremas, la carencia de agua y la presencia de iones tóxicos como la sal (Khripach *et al.*, 2000; Fariduddin *et al.*, 2014). También se ha demostrado que estas hormonas pueden incrementar la actividad de ciertos enzimas con funciones antioxidantes (Li *et al.*, 2012) e intervenir en el cierre de los estomas reduciendo de esta manera la evapotranspiración (Pustovoitova *et al.*, 2001; Haubrick *et al.*, 2006).

Esta amplia gama de efectos positivos de los brasinoesteroides sobre el desarrollo en general y la respuesta a diversos estreses les convierte en un objetivo de gran interés para la mejora vegetal. El elevado coste de los brasinoesteroides sintéticos impide actualmente su aplicación externa en la agricultura, por lo cual la modificación de mecanismos endógenos de las plantas a través de genes que intervienen en su metabolización o señalización puede ser una forma más viable para aprovechar sus beneficios (Vriet *et al.*, 2012). Un claro ejemplo en este sentido es la relevancia que ha tenido la identificación de una mutación espontánea en un gen que es el ortólogo de *BRI1* en cebada. El alelo *uzu1.a* confiere insensibilidad a los brasinoesteroides y su presencia da lugar a plantas enanas. Las líneas que portan este alelo se utilizan desde hace más de 100 años en Japón y, gracias a su resistencia contra el encamado y el incremento en el índice de cosecha, han servido como parentales para la obtención de un gran número de cultivares en Asia Oriental y para los programas de mejora actuales (Saisho *et al.*, 2004; Dockert *et al.*, 2014).

5.4.3 4166 ETSP

Las plantas mutantes de la línea 4166 ETSP presentan una elevada brotación lateral. La dominancia apical y la ramificación como resultado de la activación de yemas axilares son uno de los aspectos clave de la arquitectura de la planta. En la actualidad, la reducción de la ramificación suele ser un objetivo prevalente en la mayoría de los cultivos para facilitar la mecanización del trabajo y reducir la competencia por diferentes recursos como luz, agua y nutrientes, resultando en un aumento de la productividad (Kebrom *et al.*, 2013). Conviene resaltar, no obstante, que también existen ejemplos de lo contrario. Por ejemplo, en algunas ornamentales lo que se busca es mayor ramificación axilar, ya que la mayor brotación da plantas más atractivas por su compacidad y frondosidad. En el tomate cultivado, ambos patrones de crecimiento pueden ser interesantes. En efecto, mientras que en los cultivares de crecimiento indeterminado la reducción de la brotación lateral reduciría el trabajo necesario para su cultivo (Heuvelink y Buiskool, 1995), en los cultivares de tipo determinado una mayor ramificación podría dar como resultado un incremento de la producción (Lee *et al.*, 2015). Así pues, la identificación de la causa que provoca el fenotipo mutante en la TG2 de la línea 4166 ETSP (elevada brotación lateral) puede llegar a tener cierto interés práctico.

La disponibilidad de mutantes, la identificación de algunos de los genes involucrados y el descubrimiento de las estrigolactonas como nueva hormona vegetal han dado como resultado la creación de varios modelos para explicar la activación de las yemas axilares, un evento con una compleja regulación espacio-temporal y elevada plasticidad (Evers *et al.*, 2011; Rameau *et al.*, 2015). Varios mutantes de *Arabidopsis*, arroz, guisante y petunia con mayor brotación lateral ayudaron a entender algunos de los mecanismos que controlan el desarrollo de los tallos laterales. Los mutantes *more axillary growth (max)* de *Arabidopsis* se caracterizan por un transporte incrementado de auxinas y están alterados en la síntesis (*max1*, 3 y 4) o la señalización (*max2*) de las estrigolactonas (Bennett *et al.*, 2006; Domagalska y Leyser, 2011). De la misma manera, los mutantes *ramosus (rms)* del guisante son deficientes en la metabolización o la percepción de las estrigolactonas. Se ha demostrado que algunos de ellos están afectados en genes ortólogos a *MAX* (Sorefan *et al.*, 2003; Johnson *et al.*, 2006). Aparte de exhibir una respuesta reducida a la aplicación externa de auxinas tras su decapitación (Beveridge *et al.*, 2000), estos mutantes presentan alteraciones en los niveles de citoquininas en el xilema (Domagalska y Leyser, 2011). También se ha demostrado que algunos mutantes de arroz con una elevada brotación lateral están alterados en genes ortólogos a *MAX* o *RMS* (Zou *et al.*, 2006; Arite *et al.*, 2007; Dun *et al.*, 2012). De la misma manera, los mutantes *decreased apical dominance (dad)* de petunia se caracterizan por una reducida dominancia apical y son deficientes en la síntesis o señalización de las estrigolactonas (Rameau *et al.*, 2015).

La relevancia de las auxinas en el mantenimiento de la dominancia apical y el control de la ramificación se conoce desde los experimentos de Thimann y Skoog en 1933, pero su forma de actuación sigue siendo objeto de discusión. El motivo principal para esta controversia se basa en la observación de que estas hormonas sólo son transportadas de manera basipetal y en que, según parece, no entran en las yemas axilares (Prasad, 1993; Booker *et al.*, 2003; Petrášek y Frimel, 2009). Una de las hipótesis para resolver esta cuestión es el modelo de canalización que supone la exportación de auxinas desde un meristemo como requisito para su activación (Sachs, 1981; Li y Bangerth, 1999). Según esta teoría, un flujo de auxinas de una fuente a un sumidero, por ejemplo desde el meristemo apical hacia las raíces, inhibe nuevas afluencias de auxinas desde orígenes diferentes. La reducción del suministro desde el proveedor inicial, por un evento como la decapitación, crea un desabastecimiento en la ruta

de transporte establecida y permite la formación de nuevos canales de suministro desde las yemas axilares. El otro modelo propone la intervención de mensajeros secundarios que están bajo el control de las auxinas. Las candidatas para esta función son las citoquininas y las estrigolactonas con sus efectos opuestos sobre la brotación. El efecto positivo de las citoquininas sobre el desarrollo de los tallos laterales se conoce desde hace tiempo y se ha demostrado que las auxinas reducen la transcripción de enzimas relevantes para la síntesis de estas hormonas que, una vez transportadas a las yemas axilares, promueven su crecimiento (Sachs y Thimann, 1967; Nordström *et al.*, 2004; Tanaka *et al.*, 2006). De manera contraria, las auxinas promueven la metabolización de estrigolactonas que tienen un efecto inhibitorio sobre el desarrollo de los brotes laterales (Johnson *et al.*, 2006; Brewer *et al.*, 2009). Al regular simultáneamente de forma positiva y negativa la síntesis de dos hormonas con efectos antagonistas, las auxinas determinan indirectamente la arquitectura de la planta (Dun *et al.*, 2012). Como no todas las observaciones se explican con uno de los modelos por separado, es probable que ambos se complementen y estén involucrados en la regulación al mismo tiempo, con ciertas prevalencias según diferentes circunstancias (Domagalska y Leyser, 2011; Müller y Leyser, 2011; Waldie *et al.*, 2014).

Mientras que con estos modelos se intenta explicar la regulación de la brotación lateral por las tres hormonas más relevantes en este proceso, se desconocen en gran medida los mecanismos que ocurren en las yemas axilares como respuesta a estas señales. Hasta el momento solamente ha sido posible relacionar unos factores de transcripción de la familia TCP (*teosinte branched 1*, *cycloidea*, *proliferating cell factors*) localizados en las yemas axilares con el control de la brotación lateral. Estos factores de transcripción intervienen en una amplia gama de procesos relacionados con el crecimiento, entre ellos la activación de genes involucrados en el ciclo celular y la proliferación de células en mono- y dicotiledóneas (Martín-Trillo y Cubas, 2010). El primer gen de este grupo identificado fue *TEOSINTE BRANCHED 1 (TB1)*. Este gen se identificó a partir de un mutante de maíz (*teosinte branched1*) que, sorprendentemente, tiene un fenotipo más parecido al de los teosintes que al de las plantas de maíz. La selección de *tb1* tuvo un papel determinante en la domesticación del maíz, ya que permitió un cambio drástico en la arquitectura de la planta, hasta el punto de que a partir de una planta extremadamente ramificada (teosinte) se pasó a otra (maíz) con una elevada dominancia apical (Doebley *et al.*, 1997). Los dos parálogos de

BRC1 en tomate (el homólogo de *TB1* en *Arabidopsis*) parecen ser el resultado de una duplicación génica o la duplicación del genoma entero que ocurrió en las *Solanáceas* hace unos 60-70 millones de años y que creó dos versiones del gen ancestral *BRC1* (Fawcett *et al.*, 2009). De estas dos copias, los transcritos de *SIBRC1b* están más presentes e inhiben de forma más eficaz la ramificación en plantas de tomate (Martín-Trillo *et al.*, 2011). Líneas de pérdida de función de *SIBRC1b* obtenidas mediante la técnica de RNA de interferencia exhiben un fenotipo de elevada brotación. Para esclarecer si la otra versión de *SLBRC1*, *SIBRC1a*, perdió su función durante la domesticación, se estudió el efecto de una copia del gen de la especie silvestre *S. pennellii* (*SpBRC1a*) presente en una línea de introgresión con el cultivar de tomate M82 de la colección de Eshed y Zamir (1995). Estas plantas se caracterizan por un nivel de transcripción de la versión de *BRC1a* proveniente de *S. pennellii* (*SpBRC1a*) cuatro veces más alto que el propio de la especie cultivada. El fenotipo de la planta presenta una reducción en la brotación lateral (Martín-Trillo *et al.*, 2011). Teniendo en cuenta que la modificación de la brotación lateral puede ser un objetivo de mejora en tomate, este resultado es un buen ejemplo para una aplicación diferente del uso de especies silvestres en el estudio de los caracteres de interés agronómico.

5.4.4 4025 ETSP

La característica más destacable de las plantas mutantes identificadas en la TG2 de la línea 4025 ETSP es la ausencia de raíces normales. Esta alteración afecta, por un lado, a la raíz embrionaria y las raíces laterales cuyo crecimiento se detiene tras unos pocos milímetros de elongación. Además, diferentes explantes no forman raíces adventicias en condiciones en que las plantas WT lo hacen sin problema. En esta línea se ha llegado ya a identificar cuál es el gen etiquetado en el mutante. Las funciones del gen etiquetado y de su homólogo en *Arabidopsis* son desconocidas. Se sabe solamente que se expresan en los meristemos de las raíces, por tanto, el estudio de las alteraciones puede ayudar a entender su papel en el crecimiento radicular. Como este proceso tiene una elevada importancia para las plantas, en general, y la tolerancia a la salinidad y sequía, en particular, el estudio detallado de este mutante puede aportar conocimientos relevantes para la mejora de estos caracteres. La asignación de una función definida para el gen alterado en la línea 4025 ETSP es un reto. Su

función podría estar relacionada con las hormonas que regulan el enraizamiento como las auxinas, las citoquininas y el ácido abscísico, o con los factores de transcripción que controlan la expresión de una multitud de genes que modifican el desarrollo de las raíces (Casimiro *et al.*, 2003; Malamy, 2005; Guan *et al.*, 2015; Wachsmann *et al.*, 2015). De cualquier forma, una de las mejores alternativas para seguir profundizando en la función del gen afectado es acometer su análisis funcional mediante su silenciamiento y sobreexpresión.

Dentro de los varios mutantes de *Arabidopsis* afectados en el desarrollo de la raíz se encuentran unos pocos con fenotipos parecidos a la línea 4025 ETSP. Los mutantes *root meristemless1* y *2* (*rml1* y *2*) identificados por Chen y colaboradores (1995) exhiben un desarrollo radicular muy reducido y un fenotipo parecido al de la línea 4025 ETSP. Ambos se caracterizan por la falta de divisiones celulares en el ápice de la raíz. En lugar de ello, los tejidos correspondientes experimentan una diferenciación terminal que resulta en células vasculares y corticales, dando lugar a rudimentos radicales con una longitud de 1 a 2 milímetros. Aunque tanto *rml1* como *rml2* son capaces de iniciar primordios a partir del periciclo, solamente se observó la conversión en raíces laterales en *rml1*.

El mutante *affected lateral root formation 3* (*alf3*) también se caracteriza por una reducida longitud de la raíz embrionaria y alteraciones en el desarrollo de raíces laterales (Celenza *et al.*, 1995). En este caso, los primordios de las raíces laterales son incapaces de crecer tras emerger de la epidermis y detienen su actividad metabólica resultando en la ausencia de crecimiento tras alcanzar una longitud de unos pocos milímetros. Al contrario de la línea 4025 ETSP es posible restaurar el fenotipo silvestre mediante aplicación del ácido indolacético. En base a estos resultados los autores postularon una participación de *ALF3* en la síntesis de auxinas localizadas en los primordios, o el transporte de esta hormona hacia el primordio (Celenza *et al.*, 1995). Mientras la insensibilidad del mutante 4025 ETSP a la aplicación externa de diferentes auxinas excluye estas dos posibilidades, la ausencia de enraizamiento en los experimentos de injertos, con los ápices cultivados a diferentes concentraciones o en presencia de distintas auxinas indica que se puede tratar de un mutante con un fallo en una etapa posterior en la señalización por auxinas. Por el momento, la clasificación de la secuencia obtenida en el grupo del Dr. Lozano como 'proteína desconocida' solamente permite concluir que el gen alterado no codifica uno de los

miembros conocidos de los receptores de auxinas, factores de transcripción o cualquiera de los genes conocidos que están regulados por ellas.

El hecho de que las raíces primarias y laterales con sus distintos orígenes estén afectadas de forma similar indica que el gen alterado participa en un mecanismo común. Además, el proceso alterado parece tener una función esencial en la formación de raíces adventicias cuyo crecimiento está completamente inhibido. Mientras las células iniciales de la raíz primaria se forman durante las primeras divisiones cigóticas en el embrión de las plantas (Scheres *et al.*, 1996) y las raíces laterales provienen del periciclo (Dolan *et al.*, 1993), las raíces adventicias proceden de diferentes tipos de tejidos a través de una organogénesis directa o indirecta a partir de un callo previamente formado (Li *et al.*, 2009). Aparte de que estos tres tipos de raíces comparten una estructura básica y varios aspectos como la regulación del desarrollo por auxinas y citoquininas, o la implicación de genes como *SHR* o *RML1* que controlan su arquitectura, cada una tiene sus particularidades (Malamy, 2005; Tian *et al.*, 2014).

Otro resultado relevante para enfocar el estudio de la línea 4025 ETSP es la observación en varios experimentos de que los explantes de las plantas mutantes son capaces de formar callo, pero incapaces de desarrollar raíces adventicias. En estudios recientes se ha propuesto que la formación de un callo desorganizado y las divisiones de células del periciclo que dan lugar a la formación de raíces laterales están controlados por el mismo grupo de genes (Sugimoto *et al.*, 2010). Los resultados de estos autores sugieren que tejidos parecidos al periciclo están también presentes en órganos aéreos y que la formación de un callo no consiste en la desdiferenciación de células, sino más bien en su conversión en un tejido parecido al meristemo radicular. Los estudios que hemos realizado sobre el efecto de distintas auxinas en el enraizamiento de la línea 4025 ETSP, así como los relacionados con la respuesta morfogénica en explantes de hoja en presencia de diferentes combinaciones de auxinas y citoquininas (donde se observó la incapacidad del mutante de formar raíces en medios con auxinas) ofrecen las primeras pistas de que el gen alterado en el mutante también puede tener una función en este tipo de procesos. De esta manera, el mutante no sólo puede resultar interesante con respecto al desarrollo radicular, sino también en la comprensión de los mecanismos comunes entre enraizamiento, proliferación celular y respuesta morfogénica.

6 Conclusiones

1. Tras una mejora significativa en el método de transformación, se ha generado una colección de 2181 líneas T-DNA a partir de dos accesiones de *Solanum pennellii* con una trampa de intensificadores. Todas estas plantas transgénicas son diploides y provienen de eventos de transformación independientes.
2. Para detectar líneas T-DNA de *S. pennellii* con mutaciones que afecten a su nivel de tolerancia a estrés salino se han puesto a punto tres nuevos métodos de evaluación. Dos de ellos, el cultivo de ápices meristemáticos en medio líquido y el cultivo de ápices meristemáticos previamente enraizados, se llevan a cabo *in vitro*. El tercer método, basado en un sistema hidropónico, combina las ventajas de las evaluaciones *in vitro* e *in vivo*. Este último sistema se ha ajustado para su empleo en la evaluación de líneas T-DNA de tomate.
3. Tras el escrutinio de una colección de 887 líneas T-DNA de *S. pennellii* se han detectado mutantes con cambios en diferentes caracteres. Algunos de estos mutantes presentan una mayor hipersensibilidad al estrés salino.
4. Gracias a la puesta a punto del sistema hidropónico, se han evaluado 68 líneas T-DNA de tomate para estudiar el efecto del estrés salino en su desarrollo. Se ha descubierto que la línea 901 ET73, que exhibía menor crecimiento y pérdida de turgencia de las hojas en el invernadero, también presenta alteraciones en el desarrollo radicular. Además, se ha comprobado que los meristemos apicales se marchitan y colapsan cuando los tallos alcanzan un determinado tamaño.
5. Se han caracterizado tres mutantes del desarrollo de *Solanum pennellii*. La línea 4196 ETSP presenta una mutación de naturaleza dominante que hace que las hojas engrosen y se arruguen como ocurre en otros mutantes defectuosos en la síntesis o señalización de los brasinoesteroides. La línea 4166 ETSP presenta una mutación de naturaleza recesiva que provoca una mayor ramificación lateral y pérdida de dominancia apical. Se ha comprobado que esta mutación no está causada por ningún T-DNA ni fragmento del cuerpo del vector, por lo que se atribuye a un evento de

variación somaclonal. La línea 4025 ETSP presenta una mutación de naturaleza recesiva que hace que tanto la raíz embrionaria como las raíces adventicias detengan su crecimiento. No se ha podido revertir el fenotipo del mutante mediante la adición exógena de auxinas al medio de cultivo. Tras comprobar la cosegregación entre el inserto de T-DNA y el fenotipo mutante, se ha clonado el gen etiquetado en el mutante. El ortólogo de este gen en *Arabidopsis* se expresa mayoritariamente en las células meristemáticas de la raíz, lo que tiene relación con el fenotipo de nuestro mutante de tomate. Por otro lado, el gen de *Solanum pennellii* que hemos clonado codifica una proteína que, de momento, tiene una función desconocida.

7 Bibliografía

- Abe H., Yamaguchi-Shinozaki K., Urao T., Iwasaki T., Hosokawa D., Shinozaki K.** (1997) Role of *Arabidopsis* MYC and MYB homologs in drought-and abscisic acid-regulated gene expression. *The Plant Cell Online* 9:1859-1868.
- Abed Alrahman N.M., Shibli R.A., Ereifej K., Hindiyyeh M.Y.** (2005) Influence of salinity on growth and physiology of *in vitro* grown cucumber (*Cucumis sativus* L.).
- AbuQamar S., Luo H., Laluk K., Mickelbart M.V., Mengiste T.** (2009) Crosstalk between biotic and abiotic stress responses in tomato is mediated by the AIM1 transcription factor. *The Plant Journal* 58:347-360.
- Achard P., Cheng H., De Grauwe L., Decat J., Schoutteten H., Moritz T., Van Der Straeten D., Peng J., Harberd N.P.** (2006) Integration of plant responses to environmentally activated phytohormonal signals. *Science* 311:91-94.
- Acquaah G.** (2009) Principles of plant genetics and breeding John Wiley & Sons.
- Aguilar-Martínez J.A., Poza-Carrión C., Cubas P.** (2007) *Arabidopsis* BRANCHED1 Acts as an Integrator of Branching Signals within Axillary Buds. *The Plant Cell* 19:458-472.
- Ahammed G.J., Yuan H.-L., Ogwenó J.O., Zhou Y.-H., Xia X.-J., Mao W.-H., Shi K., Yu J.-Q.** (2012) Brassinosteroid alleviates phenanthrene and pyrene phytotoxicity by increasing detoxification activity and photosynthesis in tomato. *Chemosphere* 86:546-555.
- Aida M., Beis D., Heidstra R., Willemsen V., Blilou I., Galinha C., Nussaume L., Noh Y.-S., Amasino R., Scheres B.** (2004) The PLETHORA genes mediate patterning of the *Arabidopsis* root stem cell niche. *Cell* 119:109-120.
- Alarcon J., Sánchez-Blanco M., Bolarin M., Torrecillas A.** (1993) Water relations and osmotic adjustment in *Lycopersicon esculentum* and *L. pennellii*. during short-term salt exposure and recovery. *Physiologia Plantarum* 89:441-447.
- Albacete A., Ghanem M.E., Martínez-Andújar C., Acosta M., Sánchez-Bravo J., Martínez V., Lutts S., Dodd I.C., Pérez-Alfocea F.** (2008) Hormonal changes in relation to biomass partitioning and shoot growth impairment in salinized tomato (*Solanum lycopersicum* L.) plants. *Journal of Experimental Botany* 59:4119-4131.
- Albrecht E., Escobar M., Chetelat R.T.** (2010) Genetic diversity and population structure in the tomato-like nightshades *Solanum lycopersicoides* and *S. sitiens*. *Annals of Botany* 105:535-554.
- Ali B., Hayat S., Ahmad A.** (2007) 28-Homobrassinolide ameliorates the saline stress in chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Environmental and Experimental Botany* 59:217-223.
- Ali Y., Bashir M., Nasim M., Abbasi K., Junn B.** (1994) Effect of salinity on the cell structure in different genotypes of tomato produced by tissue culture. *Sarhad Journal of Agriculture* 10:321-325.
- Allen K.D., Sussex I.M.** (1996) *Falsiflora* and *anantha* control early stages of floral meristem development in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.). *Planta* 200:254-264.
- Alonso J.M., Stepanova A.N., Leisse T.J., Kim C.J., Chen H., Shinn P., Stevenson D.K., Zimmerman J., Barajas P., Cheuk R.** (2003) Genome-wide insertional mutagenesis of *Arabidopsis thaliana*. *Science* 301:653-657.
- Alvarado M.C., Zsigmond L.M., Kovács I., Cséplő Á., Koncz C., Szabados L.M.** (2004) Gene trapping with firefly luciferase in *Arabidopsis*. Tagging of stress-responsive genes. *Plant Physiology* 134:18-27.

- Amasino R.** (2005) 1955: Kinetin arrives. The 50th anniversary of a new plant hormone. *Plant Physiology* 138:1177-1184.
- Amtmann A., Sanders D.** (1998) Mechanisms of Na⁺ uptake by plant cells. *Advances in Botanical Research* 29:75-112.
- An S., Park S., Jeong D.-H., Lee D.-Y., Kang H.-G., Yu J.-H., Hur J., Kim S.-R., Kim Y.-H., Lee M.** (2003) Generation and analysis of end sequence database for T-DNA tagging lines in rice. *Plant Physiology* 133:2040-2047.
- Andersen Ø.M., Jordheim M., Byamukama R., Mbabazi A., Ogweng G., Skaar I., Kiremire B.** (2010) Anthocyanins with unusual furanose sugar (apiose) from leaves of *Synadenium grantii* (Euphorbiaceae). *Phytochemistry* 71:1558-1563.
- André D., Colau D., Schell J., Van Montagu M., Hernalsteens J.-P.** (1986) Gene tagging in plants by a T-DNA insertion mutagen that generates APH(3')II-plant gene fusions. *Molecular and General Genetics MGG* 204:512-518.
- Angarita M.P.** (2012) Generación de líneas T-DNA de tomate (*Solanum lycopersicon* cv. p73) e identificación de mutantes de inserción. Universitat Politècnica de València, Valencia.
- Antón M.T.** (2012) La caracterización del mutante insercional Arlequín revela que el gen etiquetado tiene un papel clave en el desarrollo reproductivo de tomate. Universidad Politècnica de Valencia, Valencia.
- Apel K., Hirt H.** (2004) Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annu. Rev. Plant Biol.* 55:373-399.
- Apse M.P., Aharon G.S., Snedden W.A., Blumwald E.** (1999) Salt tolerance conferred by overexpression of a vacuolar Na⁺/H⁺ antiport in *Arabidopsis*. *Science* 285:1256-1258.
- Araus J.L., Slafer G.A., Royo C., Serret M.D.** (2008) Breeding for yield potential and stress adaptation in cereals. *Critical Reviews in Plant Science* 27:377-412.
- Arikita F.N., Azevedo M.S., Scotton D.C., de Siqueira Pinto M., Figueira A., Peres L.E.P.** (2013) Novel natural genetic variation controlling the competence to form adventitious roots and shoots from the tomato wild relative *Solanum pennellii*. *Plant Science* 199:121-130.
- Arite T., Iwata H., Ohshima K., Maekawa M., Nakajima M., Kojima M., Sakakibara H., Kyojuka J.** (2007) DWARF10, an RMS1/MAX4/DAD1 ortholog, controls lateral bud outgrowth in rice. *The Plant Journal* 51:1019-1029.
- Arrillaga I., Gil-Mascarell R., Gisbert C., Sales E., Montesinos C., Serrano R., Moreno V.** (1998) Expression of the yeast HAL2 gene in tomato increases the *in vitro* salt tolerance of transgenic progenies. *Plant Science* 136:219-226.
- Arzani A.** (2008) Improving salinity tolerance in crop plants: a biotechnological view. *In vitro Cellular & Developmental Biology-Plant* 44:373-383.
- Ashraf M., Foolad M.** (2007) Roles of glycine betaine and proline in improving plant abiotic stress resistance. *Environmental and Experimental Botany* 59:206-216.
- Ashraf M., Akram N.A., Arteca R.N., Foolad M.R.** (2010) The physiological, biochemical and molecular roles of brassinosteroids and salicylic acid in plant processes and salt tolerance. *Critical Reviews in Plant Sciences* 29:162-190.
- Asins M.J., Villalta I., Aly M.M., Olías R., Alvarez De Morales P., Huertas R., Li J., Jaime-Pérez N., Haro R., Raga V.** (2013) Two closely linked tomato HKT coding genes are positional candidates for the major tomato QTL involved in Na⁺/K⁺ homeostasis. *Plant, Cell & Environment* 36:1171-1191.
- Atarés A., Moyano E., Morales B., Schleicher P., García-Abellán J.O., Antón T., García-Sogo B., Perez-Martin F., Lozano R., Flores F.B.** (2011) An insertional mutagenesis

- programme with an enhancer trap for the identification and tagging of genes involved in abiotic stress tolerance in the tomato wild-related species *Solanum pennellii*. *Plant Cell Reports* 30:1865-1879.
- Atherton J., Rudich J.** (1986) The tomato crop: A scientific basis for improvement. Springer Netherlands.
- Atta R., Laurens L., Boucheron-Dubuisson E., Guivarc'h A., Carnero E., Giraudat-Pautot V., Rech P., Chriqui D.** (2009) Pluripotency of *Arabidopsis* xylem pericycle underlies shoot regeneration from root and hypocotyl explants grown *in vitro*. *The Plant Journal* 57:626-644.
- Auerbach C., Robson J.M.** (1946) Chemical production of mutations. *Nature* 157:302.
- Azpiroz R., Wu Y., LoCascio J.C., Feldmann K.A.** (1998) An *Arabidopsis* brassinosteroid-dependent mutant is blocked in cell elongation. *The Plant Cell* 10:219-230.
- Azpiroz-Leehan R., Feldmann K.A.** (1997) T-DNA insertion mutagenesis in *Arabidopsis*: going back and forth. *Trends in Genetics* 13:152-156.
- Babiychuk E., Fuangthong M., Van Montagu M., Inzé D., Kushnir S.** (1997) Efficient gene tagging in *Arabidopsis thaliana* using a gene trap approach. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 94:12722-12727.
- Baek Y.S., Covey P.A., Petersen J.J., Chetelat R.T., McClure B., Bedinger P.A.** (2015) Testing the SI × SC rule: Pollen–pistil interactions in interspecific crosses between members of the tomato clade (*Solanum* section *Lycopersicon*, *Solanaceae*). *American Journal of Botany* 102:302-311.
- Bai Y., Lindhout P.** (2007) Domestication and breeding of tomatoes: What have we gained and what can we gain in the future? *Annals of Botany* 100:1085-1094.
- Bailly C., Audigier C., Ladonne F., Wagner M.H., Coste F., Corbineau F., Côme D.** (2001) Changes in oligosaccharide content and antioxidant enzyme activities in developing bean seeds as related to acquisition of drying tolerance and seed quality. *Journal of Experimental Botany* 52:701-708.
- Bairu M.W., Kane M.E.** (2011) Physiological and developmental problems encountered by *in vitro* cultured plants. *Plant Growth Regulation* 63:101-103.
- Bajguz A.** (2000) Effect of brassinosteroids on nucleic acids and protein content in cultured cells of *Chlorella vulgaris*. *Plant Physiology and Biochemistry* 38:209-215.
- Balibrea M.E., Rus-Alvarez A.M., Bolarín M.C., Pérez-Alfocea F.** (1997) Fast changes in soluble carbohydrates and proline contents in tomato seedlings in response to ionic and non-ionic iso-osmotic stresses. *Journal of Plant Physiology* 151:221-226.
- Bao F., Shen J., Brady S.R., Muday G.K., Asami T., Yang Z.** (2004) Brassinosteroids interact with auxin to promote lateral root development in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 134:1624-1631.
- Barampuram S., Zhang Z.J.** (2011) Recent advances in plant transformation, in: J. A. Birchler (Ed.), *Plant Chromosome Engineering*, Springer. pp. 1-35.
- Barcaccia G.** (2010) Molecular markers for characterizing and conserving crop plant germplasm, in: S. M. Jain and D. S. Brar (Eds.), *Molecular Techniques in Crop Improvement*, Springer. pp. 231-254.
- Bar-Dror T., Dermastia M., Kladnik A., Žnidarič M.T., Novak M.P., Meir S., Burd S., Philosoph-Hadas S., Ori N., Sonogo L., Dickman M.B., Lers A.** (2011) Programmed cell death occurs asymmetrically during abscission in tomato. *The Plant Cell Online* 23:4146-4163.
- Barone A., Chiusano M.L., Ercolano M.R., Giuliano G., Grandillo S., Frusciante L.** (2008) Structural and functional genomics of tomato. *International Journal of Plant*

- Genomics 2008:820274
- Bartels D., Sunkar R.** (2005) Drought and salt tolerance in plants. *Critical Reviews in Plant Sciences* 24:23-58.
- Barthels N., van der Lee F.M., Klap J., Goddijn O., Karimi M., Puzio P., Grundler F., Ohl S.A., Lindsey K., Robertson L.** (1997) Regulatory sequences of *Arabidopsis* drive reporter gene expression in nematode feeding structures. *The Plant Cell Online* 9:2119-2134.
- Bauchet G., Causse M.** (2012) Genetic diversity in tomato (*Solanum lycopersicum*) and its wild relatives. *Genetic Diversity in Plants*:133-162.
- Baum K., Gröning B., Meier I.** (1997) Improved ballistic transient transformation conditions for tomato fruit allow identification of organ-specific contributions of I-box and G-box to the RBCS2 promoter activity. *The Plant Journal* 12:463-469.
- Bedinger P., Chetelat R., McClure B., Moyle L., Rose J.C., Stack S., van der Knaap E., Baek Y., Lopez-Casado G., Covey P., Kumar A., Li W., Nunez R., Cruz-Garcia F., Royer S.** (2011) Interspecific reproductive barriers in the tomato clade: opportunities to decipher mechanisms of reproductive isolation. *Sexual Plant Reproduction* 24:171-187.
- Bellini C., Pacurar D.I., Perrone I.** (2014) Adventitious roots and lateral roots: similarities and differences. *Annual Review of Plant Biology* 65:639-666.
- Bennett T., Sieberer T., Willett B., Booker J., Luschnig C., Leyser O.** (2006) The *Arabidopsis* MAX pathway controls shoot branching by regulating auxin transport. *Current Biology* 16:553-563.
- Bennett M.J., Marchant A., Green H.G., May S.T., Ward S.P., Millner P.A., Walker A.R., Schulz B., Feldmann K.A.** (1996) *Arabidopsis* AUX1 gene: a permease-like regulator of root gravitropism. *Science* 273:948-950.
- Bergougnoux V.** (2014) The history of tomato: From domestication to biopharming. *Biotechnology Advances* 32:170-189.
- Bernacchi D., Tanksley S.D.** (1997) An interspecific backcross of *Lycopersicon esculentum* X *L. hirsutum*: Linkage analysis and a QTL study of sexual compatibility factors and floral traits. *Genetics* 147:861-877.
- Bernatzky R., Glaven R.H., Rivers B.A.** (1995) S-related protein can be recombined with self-compatibility in interspecific derivatives of *Lycopersicon*. *Biochemical Genetics* 33:215-225.
- Berry T., Bewley J.D.** (1992) A role for the surrounding fruit tissues in preventing the germination of tomato (*Lycopersicon esculentum*) seeds : A consideration of the osmotic environment and abscisic acid. *Plant Physiology* 100:951-957.
- Beveridge C.A., Symons G.M., Turnbull C.G.** (2000) Auxin inhibition of decapitation-induced branching is dependent on graft-transmissible signals regulated by genes RMS1 and RMS2. *Plant Physiology* 123:689-698.
- Bhat M.A., Jamshieed S., Mujib A., Azooz M.M., Mahmooduzzafar, Aslam J., Ahmad P.** (2013) Plant tissue culture: A useful measure for the screening of salt tolerance in plants, in: P. Ahmad, *et al.* (Eds.), *Salt Stress in Plants: Signalling, Omics and Adaptations*, Springer New York, New York, NY. pp. 465-495.
- Bishop G.J., Yokota T.** (2001) Plants steroid hormones, brassinosteroids: Current highlights of molecular aspects on their synthesis/metabolism, transport, perception and response. *Plant and Cell Physiology* 42:114-120.
- Bishop G.J., Harrison K., Jones J.** (1996) The tomato Dwarf gene isolated by heterologous transposon tagging encodes the first member of a new cytochrome P450 family. *The Plant Cell Online* 8:959-969.

- Blanca J., Cañizares J., Cordero L., Pascual L., Díez M.J., Nuez F.** (2012) Variation revealed by SNP genotyping and morphology provides insight into the origin of the tomato. *PLoS* 7(10):e48198
- Blanca J., Montero-Pau J., Sauvage C., Bauchet G., Illa E., Díez M.J., Francis D., Causse M., van der Knaap E., Cañizares J.** (2015) Genomic variation in tomato, from wild ancestors to contemporary breeding accessions. *BMC Genomics* 16:257.
- Blum A.** (1988) *Plant breeding for stress environments*. CRC Press, The University of Michigan
- Blum A.** (1996) Crop responses to drought and the interpretation of adaptation. *Plant Growth Regulation* 20:135-148.
- Blum A.** (2011) Drought resistance—is it really a complex trait? *Functional Plant Biology* 38:753-757.
- Blumwald E., Aharon G.S., Apse M.P.** (2000) Sodium transport in plant cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes* 1465:140-151.
- Boerjan W., Cervera M.-T., Delarue M., Beeckman T., Dewitte W., Bellini C., Caboche M., Van Onckelen H., Van Montagu M., Inzé D.** (1995) *Superroot*, a recessive mutation in *Arabidopsis*, confers auxin overproduction. *The Plant Cell* 7:1405-1419.
- Bohnert H.J., Nelson D.E., Jensen R.G.** (1995) Adaptations to environmental stresses. *The Plant Cell* 7:1099.
- Bolarin M., Fernandez F., Cruz V., Cuartero J.** (1991) Salinity tolerance in four wild tomato species using vegetative yield-salinity response curves. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 116:286-290.
- Bolarín M.C., Santa-Cruz A., Cayuela E., Pérez-Alfocea F.** (1995) Short-term solute changes in leaves and roots of cultivated and wild tomato seedlings under salinity. *Journal of Plant Physiology* 147:463-468.
- Bolger A., Scossa F., Bolger M.E., Lanz C., Maumus F., Tohge T., Quesneville H., Alseekh S., Sorensen I., Lichtenstein G., Fich E.A., Conte M., Keller H., Schneeberger K., Schwacke R., Ofner I., Vrebalov J., Xu Y., Osorio S., Aflitos S.A., Schijlen E., Jimenez-Gomez J.M., Ryngajllo M., Kimura S., Kumar R., Koenig D., Headland L.R., Maloof J.N., Sinha N., van Ham R.C.H.J., Lankhorst R.K., Mao L., Vogel A., Arsova B., Panstruga R., Fei Z., Rose J.K.C., Zamir D., Carrari F., Giovannoni J.J., Weigel D., Usadel B., Fernie A.R.** (2014) The genome of the stress-tolerant wild tomato species *Solanum pennellii*. *Nature Genetics* 46:1034-1038.
- Booker J., Chatfield S., Leyser O.** (2003) Auxin acts in xylem-associated or medullary cells to mediate apical dominance. *The Plant Cell* 15:495-507.
- Bordas M., Montesinos C., Dabauza M., Salvador A., Roig L.A., Serrano R., Moreno V.** (1997) Transfer of the yeast salt tolerance gene HAL1 to *Cucumis melo* L. cultivars and *in vitro* evaluation of salt tolerance. *Transgenic Research* 6:41-50.
- Borsani O., Valpuesta V., Botella M.** (2003) Developing salt tolerant plants in a new century: a molecular biology approach. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 73:101-115.
- Borsani O., Cuartero J., Fernández J.A., Valpuesta V., Botella M.A.** (2001) Identification of two loci in tomato reveals distinct mechanisms for salt tolerance. *The Plant Cell* 13:873-887.
- Bourgeois-Chaillou P., Guerrier G.** (1992) Salt-responses in *Lycopersicon esculentum* calli and whole plants. *Journal of Plant Physiology* 140:494-501.
- Bournival B., Vallejos C., Scott J.** (1990) Genetic analysis of resistances to races 1 and 2 of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* from the wild tomato *Lycopersicon pennellii*. *Theoretical and Applied Genetics* 79:641-645.

- Braun A.C.** (1941) Development of secondary tumor and tumor strands in the crown-gall of sunflowers. *Phytopathology* 31:135–149
- Braun A.C.** (1950) Thermal inactivation studies on the tumor inducing principle in crown-gall. *Phytopathology* 40:3.
- Braun A.C., White P.R.** (1943) Bacteriological sterility of tissues derived from secondary crown-gall tumors. *Phytopathology* 33:85 - 100.
- Braun N., de Saint Germain A., Pillot J.-P., Boutet-Mercey S., Dalmais M., Antoniadi I., Li X., Maia-Grondard A., Le Signor C., Bouteiller N., Luo D., Bendahmane A., Turnbull C., Rameau C.** (2012) The pea TCP transcription factor PsBRC1 acts downstream of strigolactones to control shoot branching. *Plant Physiology* 158:225-238.
- Bray E.A.** (2004) Genes commonly regulated by water-deficit stress in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Experimental Botany* 55:2331-2341.
- Breton G., Danyluk J., Charron J.-B.t.F., Sarhan F.** (2003) Expression profiling and bioinformatic analyses of a novel stress-regulated multispanning transmembrane protein family from cereals and *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 132:64-74.
- Brewer P.B., Dun E.A., Ferguson B.J., Rameau C., Beveridge C.A.** (2009) Strigolactone acts downstream of auxin to regulate bud outgrowth in pea and *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 150:482-493.
- Brunaud V., Balzergue S., Dubreucq B., Aubourg S., Samson F., Chauvin S., Bechtold N., Cruaud C., DeRose R., Pelletier G.** (2002) T-DNA integration into the *Arabidopsis* genome depends on sequences of pre-insertion sites. *EMBO reports* 3:1152-1157.
- Buckler E.S., Thornsberry J.M., Kresovich S.** (2001) Molecular diversity, structure and domestication of grasses. *Genetical research* 77:213-218.
- Buddendorf-Joosten J.M.C., Woltering E.J.** (1994) Components of the gaseous environment and their effects on plant growth and development *in vitro*. *Plant Growth Regulation* 15:1-16.
- Caicedo A., Peralta I.** (2013) Basic information about tomatoes and the tomato group, in: B.A. Liedl, *et al.* (Eds.), *Genetics, Genomics and Breeding of Tomato*, CRC Press. pp 1-36.
- Campisi L., Yang Y., Yi Y., Heilig E., Herman B., Cassista A.J., Allen D.W., Xiang H., Jack T.** (1999) Generation of enhancer trap lines in *Arabidopsis* and characterization of expression patterns in the inflorescence. *The Plant Journal* 17:699-707.
- Campos J.F., Cara B., Pérez-Martín F., Pineda B., Egea I., Flores F.B., Fernandez-Garcia N., Capel J., Moreno V., Angosto T.** (2015) The tomato mutant *ars1* (*altered response to salt stress 1*) identifies an R1-type MYB transcription factor involved in stomatal closure under salt acclimation. *Plant Biotechnology Journal* 14: 1346-1356
- Cannon W.A.** (1911) *The root habits of desert plants* Carnegie Institution of Washington.
- Cano E.A., Pérez-Alfocea F., Moreno V., Bolarin M.C.** (1996) Responses to NaCl stress of cultivated and wild tomato species and their hybrids in callus cultures. *Plant Cell Reports* 15:791-794.
- 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* 53:19-26.
- Caño-Delgado A., Yin Y., Yu C., Vafeados D., Mora-García S., Cheng J.-C., Nam K.H., Li J., Chory J.** (2004) BRL1 and BRL3 are novel brassinosteroid receptors that function in vascular differentiation in *Arabidopsis*. *Development* 131:5341-5351.
- Cao S., Ye M., Jiang S.** (2005) Involvement of GIGANTEA gene in the regulation of the cold stress response in *Arabidopsis*. *Plant Cell Reports* 24:683-690.

- Carretero C., Cantos M., García J., Troncoso A.** (2007) *In vitro*–*ex vitro* salt (NaCl) tolerance of cassava (*Manihot esculenta* Crantz) plants. *In vitro Cellular & Developmental Biology-Plant* 43:364-369.
- Carroll B.J., Klimyuk V.I., Thomas C.M., Bishop G.J., Harrison K., Scofield S.R., Jones J.D.** (1995) Germinal transpositions of the maize element Dissociation from T-DNA loci in tomato. *Genetics* 139:407.
- Carter J.D., Pereira A., Dickerman A.W., Veilleux R.E.** (2013) An active Ac/Ds transposon system for activation tagging in tomato cultivar M82 using clonal propagation. *Plant Physiology* 162:145-156.
- Casimiro I., Beeckman T., Graham N., Bhalerao R., Zhang H., Casero P., Sandberg G., Bennett M.J.** (2003) Dissecting *Arabidopsis* lateral root development. *Trends in Plant Science* 8:165-171.
- Casson S.A., Chilley P.M., Topping J.F., Evans I.M., Souter M.A., Lindsey K.** (2002) The POLARIS gene of *Arabidopsis* encodes a predicted peptide required for correct root growth and leaf vascular patterning. *The Plant Cell Online* 14:1705-1721.
- Castle L.A., Errampalli D., Atherton T.L., Franzmann L.H., Yoon E.S., Meinke D.W.** (1993) Genetic and molecular characterization of embryonic mutants identified following seed transformation in *Arabidopsis*. *Molecular and General Genetics* 241:504-514.
- Celenza J., Grisafi P.L., Fink G.R.** (1995) A pathway for lateral root formation in *Arabidopsis thaliana*. *Genes & Development* 9:2131-2142.
- Chakrabarti M., Zhang N., Sauvage C., Muñoz S., Blanca J., Cañizares J., Diez M.J., Schneider R., Mazourek M., McClead J.** (2013) A cytochrome P450 regulates a domestication trait in cultivated tomato. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110:17125-17130.
- Chalivendra S.C., Lopez-Casado G., Kumar A., Kassenbrock A.R., Royer S., Tovar-Méndez A., Covey P.A., Dempsey L.A., Randle A.M., Stack S.M., Rose J.K.C., McClure B., Bedinger P.A.** (2013) Developmental onset of reproductive barriers and associated proteome changes in stigma/styles of *Solanum pennellii*. *Journal of Experimental Botany* 64:265-279.
- Chalker-Scott L.** (2002) Do anthocyanins function as osmoregulators in leaf tissues? *Advances in Botanical Research* 37:103-127.
- Chaves M.M., Flexas J., Pinheiro C.** (2009) Photosynthesis under drought and salt stress: regulation mechanisms from whole plant to cell. *Annals of Botany* 103:551-560.
- Chaves M.M., Pereira J.S., Maroco J., Rodrigues M.L., Ricardo C.P.P., Osório M.L., I. C., Faria T., Pinheiro C.** (2002) How plants cope with water stress in the field? Photosynthesis and Growth. *Annals of Botany* 89:907-916.
- Chen K.-Y., Tanksley S.D.** (2004) High-resolution mapping and functional analysis of se2.1: A major stigma exertion Quantitative Trait Locus associated with the evolution from allogamy to autogamy in the genus *Lycopersicon*. *Genetics* 168:1563-1573.
- Chen K.-Y., Cong B., Wing R., Vrebalov J., Tanksley S.D.** (2007) Changes in regulation of a transcription factor lead to autogamy in cultivated tomatoes. *Science* 318:643-645.
- Chen S., Jin W., Wang M., Zhang F., Zhou J., Jia Q., Wu Y., Liu F., Wu P.** (2003) Distribution and characterization of over 1000 T-DNA tags in rice genome. *The Plant Journal* 36:105-113.
- Cheng J.-C., Seeley K.A., Sung Z.R.** (1995) RML1 and RML2, *Arabidopsis* genes required for cell proliferation at the root tip. *Plant Physiology* 107:365-376.
- Cheng Z.-M., Schnurr J., Kapaun J.** (1998) Timentin as an alternative antibiotic for suppression of *Agrobacterium tumefaciens* in genetic transformation. *Plant Cell*

- Reports 17:646-649.
- Chetelat R.T., DeVerna J.W.** (1991) Expression of unilateral incompatibility in pollen of *Lycopersicon pennellii* is determined by major loci on chromosomes 1, 6 and 10. *Theoretical and Applied Genetics* 82:704-712.
- Chetelat R.T., Ji Y.** (2006) Cytogenetics and evolution, in: M. K. Razdan and A. K. Mattoo (Eds.), *Genetic improvement of Solanaceous crops*, Science Publishers, Enfield, New Hampshire, USA. pp. 77-112.
- Chilton M.-D., Drummond M.H., Merlo D.J., Sciaky D., Montoya A.L., Gordon M.P., Nester E.W.** (1977) Stable incorporation of plasmid DNA into higher plant cells: the molecular basis of crown gall tumorigenesis. *Cell* 11:263-271.
- Chinnusamy V., Jagendorf A., Zhu J.-K.** (2005) Understanding and improving salt tolerance in plants. *Crop Science* 45:437-448.
- Chory J., Nagpal P., Peto C.A.** (1991) Phenotypic and genetic analysis of *det2*, a new mutant that affects light-regulated seedling development in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 3:445-459.
- Chyi Y.-S., Jorgensen R., Goldstein D., Tanksley S., Loaiza-Figueroa F.** (1986) Locations and stability of *Agrobacterium*-mediated T-DNA insertions in the *Lycopersicon* genome. *Molecular and General Genetics MGG* 204:64-69.
- Claeys H., Inzé D.** (2013) The agony of choice: how plants balance growth and survival under water-limiting conditions. *Plant Physiology* 162:1768-1779.
- Claussen W.** (2005) Proline as a measure of stress in tomato plants. *Plant Science* 168:241-248.
- Clouse S.D.** (2011) Brassinosteroid signal transduction: from receptor kinase activation to transcriptional networks regulating plant development. *The Plant Cell* 23:1219-1230.
- Clouse S.D.** (2015) A history of brassinosteroid research from 1970 through 2005: Thirty-five years of phytochemistry, physiology, genes, and mutants. *Journal of Plant Growth Regulation* 34:828-844.
- Clouse S.D., Langford M., McMorris T.C.** (1996) A brassinosteroid-insensitive mutant in *Arabidopsis thaliana* exhibits multiple defects in growth and development. *Plant Physiology* 111:671-678.
- Clouse S.D., Hall A.F., Langford M., McMorris T.C., Baker M.E.** (1993) Physiological and molecular effects of brassinosteroids on *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Plant Growth Regulation* 12:61-66.
- Cluster P.D., O'Dell M., Metzloff M., Flavell R.B.** (1996) Details of T-DNA structural organization from a transgenic *Petunia* population exhibiting co-suppression. *Plant Molecular Biology* 32:1197-1203.
- Cohen A., Plant Á.L., Moses M.S., Bray E.A.** (1991) Organ-specific and environmentally regulated expression of two abscisic acid-induced genes of tomato: Nucleotide sequence and analysis of the corresponding cDNAs. *Plant Physiology* 97:1367-1374.
- Colmer T.D., Epstein E., Dvorak J.** (1995) Differential solute regulation in leaf blades of various ages in salt-sensitive wheat and a salt-tolerant wheat x *Lophopyrum elongatum* (Host) A. Love amphiploid. *Plant Physiology* 108:1715-1724.
- Cominelli E., Conti L., Tonelli C., Galbiati M.** (2013) Challenges and perspectives to improve crop drought and salinity tolerance. *New Biotechnology* 30:355-361.
- Cong B., Barrero L.S., Tanksley S.D.** (2008) Regulatory change in YABBY-like transcription factor led to evolution of extreme fruit size during tomato domestication. *Nature Genetics* 40:800-804.
- Tomato Genome Consortium** (2012) The tomato genome sequence provides insights into

- fleshy fruit evolution. *Nature* 485:635-641.
- Costa M.G.C., Nogueira F.T.S., Figueira M.L., Otoni W.C., Brommonschenkel S.H., Cecon P.R.** (2000) Influence of the antibiotic timentin on plant regeneration of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) cultivars. *Plant Cell Reports* 19:327-332.
- Cruz V., Cuartero J., Bolarin M., Romero M.** (1990) Evaluation of characters for ascertaining salt stress responses in *Lycopersicon* species. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 115:1000-1003.
- Cuartero J., Fernández-Muñoz R.** (1998) Tomato and salinity. *Scientia Horticulturae* 78:83-125.
- Cuartero J., Bolarin M.C., Moreno V., Pineda B.** (2010) Molecular tools for enhancing salinity tolerance in plants, in: *Molecular Techniques in Crop Improvement*, Springer. pp. 373-405.
- Cuesta C., Wabnik K., Benková E.** (2014) Systems approaches to study root architecture dynamics, in: W. Schmidt (Eds.) *Root Systems Biology*, Frontiers Media SA
- Cui H.** (2012) Killing two birds with one stone: Transcriptional regulators coordinate development and stress responses in plants. *Plant signaling & behavior* 7:701-703.
- Cuin T.A., Miller A.J., Laurie S.A., Leigh R.A.** (2003) Potassium activities in cell compartments of salt-grown barley leaves. *Journal of Experimental Botany* 54:657-661.
- Da Costa C.T., de Almeida M.R., Ruedell C.M., Schwambach J., Maraschin F.S., Fett-Neto A.G.** (2013) When stress and development go hand in hand: main hormonal controls of adventitious rooting in cuttings. *Front Plant Sci* 4:1-19.
- De Block M., Herrera-Estrella L., Van Montagu M., Schell J., Zambryski P.** (1984) Expression of foreign genes in regenerated plants and in their progeny. *The EMBO Journal* 3:1681.
- De Costa W., Zörb C., Hartung W., Schubert S.** (2007) Salt resistance is determined by osmotic adjustment and abscisic acid in newly developed maize hybrids in the first phase of salt stress. *Physiologia Plantarum* 131:311-321.
- De Dorlodot S., Forster B., Pagès L., Price A., Tuberosa R., Draye X.** (2007) Root system architecture: opportunities and constraints for genetic improvement of crops. *Trends in Plant Science* 12:474-481.
- De Greve H., Nguyen V.K., Deboeck F., Thia-Toong L., Karimi M., Hernalsteens J.-P.** (2001) T-DNA tagging of the translation initiation factor eIF-4A1 of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Science* 161:685-693.
- De Jong M., Leyser O.** (2012) Developmental plasticity in plants. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* 77:63-73.
- De Martino G., Pan I., Emmanuel E., Levy A., Irish V.F.** (2006) Functional analyses of two tomato APETALA3 genes demonstrate diversification in their roles in regulating floral development. *The Plant Cell* 18:1833-1845.
- Debergh P., Aitken-Christie J., Cohen D., Grout B., Von Arnold S., Zimmerman R., Ziv M.** (1992) Reconsideration of the term 'vitrification' as used in micropropagation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 30:135-140.
- Dehan K., Tal M.** (1978) Salt tolerance in the wild relatives of the cultivated tomato: responses of *Solanum pennellii* to high salinity. *Irrigation Science* 1:71-76.
- Dellaporta S.L., Wood J., Hicks J.B.** (1983) A plant DNA miniprep: version II. *Plant Molecular Biology Reporter* 1:19-21.
- Dhaubhadel S., Chaudhary S., Dobinson K.F., Krishna P.** (1999) Treatment with 24-epibrassinolide, a brassinosteroid, increases the basic thermotolerance of *Brassica napus* and tomato seedlings. *Plant Molecular Biology* 40:333-342.

- Dhaubhadel S., Browning K.S., Gallie D.R., Krishna P.** (2002) Brassinosteroid functions to protect the translational machinery and heat-shock protein synthesis following thermal stress. *The Plant Journal* 29:681-691.
- Di Laurenzio L., Wysocka-Diller J., Malamy J.E., Pysh L., Helariutta Y., Freshour G., Hahn M.G., Feldmann K.A., Benfey P.N.** (1996) The SCARECROW gene regulates an asymmetric cell division that is essential for generating the radial organization of the *Arabidopsis* root. *Cell* 86:423-433.
- DiDonato R.J., Arbuckle E., Buker S., Sheets J., Tobar J., Totong R., Grisafi P., Fink G.R., Celenza J.L.** (2004) *Arabidopsis* ALF4 encodes a nuclear-localized protein required for lateral root formation. *The Plant Journal* 37:340-353.
- Dielen V., Marc D., Kinet J.-M.** (1998) Flowering in the *uniflora* mutant of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.): description of the reproductive structure and manipulation of flowering time. *Plant Growth Regulation* 25:149-157.
- Dielen V., Quinet M., Chao J., Batoko H., Havelange A., Kinet J.-M.** (2004) UNIFLORA, a pivotal gene that regulates floral transition and meristem identity in tomato (*Lycopersicon esculentum*). *New Phytologist* 161:393-400.
- Divi U.K., Krishna P.** (2009) Brassinosteroid: a biotechnological target for enhancing crop yield and stress tolerance. *New Biotechnology* 26:131-136.
- Divi U.K., Krishna P.** (2009) Brassinosteroids confer stress tolerance, in: H. Hirt (Ed.), *Plant Stress Biology: From Genomics to Systems Biology*, Wiley-VCH Verlag, Weinheim. pp. 119-135.
- Divi U.K., Rahman T., Krishna P.** (2010) Brassinosteroid-mediated stress tolerance in *Arabidopsis* shows interactions with abscisic acid, ethylene and salicylic acid pathways. *BMC Plant Biology* 10:151-165.
- Divi U.K., Rahman T., Krishna P.** (2015) Gene expression and functional analyses in brassinosteroid-mediated stress tolerance. *Plant Biotechnology Journal* 14:419-432.
- Dockter C., Gruszka D., Braumann I., Druka A., Druka I., Franckowiak J., Gough S.P., Janeczko A., Kurowska M., Lundqvist J.** (2014) Induced variations in brassinosteroid genes define barley height and sturdiness, and expand the Green Revolution genetic toolkit. *Plant Physiology* 166:1912-1927.
- Doebley J., Stec A., Hubbardt L.** (1997) The evolution of apical dominance in maize. *Nature* 386: 485-488.
- Doebley J., Stec A., Gustus C.** (1995) *teosinte branched1* and the origin of maize: Evidence for epistasis and the evolution of dominance. *Genetics* 141:333-346.
- Doebley J.F., Gaut B.S., Smith B.D.** (2006) The molecular genetics of crop domestication. *Cell* 127:1309-1321.
- Doganlar S., Frary A., Tanksley S.D.** (2000) The genetic basis of seed-weight variation: tomato as a model system. *Theoretical and Applied Genetics* 100:1267-1273.
- Dolan L., Janmaat K., Willemsen V., Linstead P., Poethig S., Roberts K., Scheres B.** (1993) Cellular organisation of the *Arabidopsis thaliana* root. *Development* 119:71-84.
- Domagalska M.A., Leyser O.** (2011) Signal integration in the control of shoot branching. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 12:211-221.
- Domagalska M.A., Sarnowska E., Nagy F., Davis S.J.** (2010) Genetic analyses of interactions among gibberellin, abscisic acid, and brassinosteroids in the control of flowering time in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS One* 5:e14012.
- Dooner H.K., Belachew A.** (1989) Transposition pattern of the maize element Ac from the bz-m2 (Ac) allele. *Genetics* 122:447-457.
- Dooner H.K., Keller J., Harper E., Ralston E.** (1991) Variable patterns of transposition of the

- maize element activator in tobacco. *The Plant Cell Online* 3:473-482.
- Dorweiler J., Stec A., Kermicle J., Doebley J.** (1993) *teosinte glume architecture 1*: a genetic locus controlling a key step in maize evolution. *Science* 262:233-235.
- Dracup M.** (1991) Increasing salt tolerance of plants through cell culture requires greater understanding of tolerance mechanisms. *Functional Plant Biology* 18:1-15.
- Dumbroff E., Cooper A.** (1974) Effects of salt stress applied in balanced nutrient solutions at several stages during growth of tomato. *Botanical Gazette*:219-224.
- Dun E.A., de Saint Germain A., Rameau C., Beveridge C.A.** (2012) Antagonistic action of strigolactone and cytokinin in bud outgrowth control. *Plant Physiology* 158:487-498.
- Egea I., Plasencia F., Pineda B., Garcia-Abellan J.O., Garcia-Alcazar M., Flores Anton B., Atares A., Angosto T., Lozano R., Moreno V., Bolarín M.C.** (2014) The high shoot Na⁺ accumulation in a salt-hipersensitive tomato mutant is related to altered expression pattern of HKT gene family. , SEB Annual Main Meeting.
- Ellul P., Rios G., Atares A., Roig L., Serrano R., Moreno V.** (2003) The expression of the *Saccharomyces cerevisiae* HAL1 gene increases salt tolerance in transgenic watermelon [*Citrullus lanatus* (Thunb.) Matsun.& Nakai.]. *Theoretical and Applied Genetics* 107:462-469.
- Emmanuel E., Levy A.A.** (2002) Tomato mutants as tools for functional genomics. *Current Opinion in Plant Biology* 5:112-117.
- Enoki H., Izawa T., Kawahara M., Komatsu M., Koh S., Kyojuka J., Shimamoto K.** (1999) Ac as a tool for the functional genomics of rice. *The Plant Journal* 19:605-613.
- Ermel F.F., Vizoso S., Charpentier J.-P., Jay-Allemand C., Catesson A.-M., Couée I.** (2000) Mechanisms of primordium formation during adventitious root development from walnut cotyledon explants. *Planta* 211:563-574.
- Eryilmaz F.** (2006) The relationships between salt stress and anthocyanin content in higher plants. *Biotechnology & Biotechnological Equipment* 20:47-52.
- Escobar M.A., Dandekar A.M.** (2003) *Agrobacterium tumefaciens* as an agent of disease. *Trends in Plant Science* 8:380-386.
- Eshed Y., Zamir D.** (1995) An introgression line population of *Lycopersicon pennellii* in the cultivated tomato enables the identification and fine mapping of yield-associated QTL. *Genetics* 141:1147-1162.
- Eshed Y., Abu-Abied M., Saranga Y., Zamir D.** (1992) *Lycopersicon esculentum* lines containing small overlapping introgressions from *L. pennellii*. *Theoretical and Applied Genetics* 83:1027-1034.
- Essah P.A., Davenport R., Tester M.** (2003) Sodium influx and accumulation in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 133:307-318.
- Evers J.B., van der Krol A.R., Vos J., Struik P.C.** (2011) Understanding shoot branching by modelling form and function. *Trends in Plant Science* 16:464-467.
- Fahad S., Hussain S., Matloob A., Khan F.A., Khaliq A., Saud S., Hassan S., Shan D., Khan F., Ullah N., Faiq M., Khan M.R., Tareen A.K., Khan A., Ullah A., Ullah N., Huang J.** (2014) Phytohormones and plant responses to salinity stress: a review. *Plant Growth Regulation* 75:391-404.
- Fariduddin Q., Yusuf M., Ahmad I., Ahmad A.** (2014) Brassinosteroids and their role in response of plants to abiotic stresses. *Biologia Plantarum* 58:9-17.
- Farrar K., Evans I.M., Topping J.F., Souter M.A., Nielsen J.E., Lindsey K.** (2003) EXORDIUM—a gene expressed in proliferating cells and with a role in meristem function, identified by promoter trapping in *Arabidopsis*. *The Plant Journal* 33:61-73.
- Fawcett J.A., Maere S., Van de Peer Y.** (2009) Plants with double genomes might have had a

- better chance to survive the Cretaceous–Tertiary extinction event. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106:5737-5742.
- Fedoroff N.V., Smith D.L.** (1993) A versatile system for detecting transposition in *Arabidopsis*. *The Plant Journal* 3:273-289.
- Fedoroff N., Wessler S., Shure M.** (1983) Isolation of the transposable maize controlling elements Ac and Ds. *Cell* 35:235-242.
- Fernández-Lozano A., Yuste-Lisbona F.J., Pérez-Martín F., Pineda B., Moreno V., Lozano R., Angosto T.** (2015) Mutation at the tomato EXCESSIVE NUMBER OF FLORAL ORGANS (ENO) locus impairs floral meristem development, thus promoting an increased number of floral organs and fruit size. *Plant Science* 232:41-48.
- Finkelstein R.R., Lynch T.J.** (2000) The *Arabidopsis* abscisic acid response gene ABI5 encodes a basic leucine zipper transcription factor. *The Plant Cell Online* 12:599-609.
- Flowers T.** (2004) Improving crop salt tolerance. *Journal of Experimental Botany* 55:307-319.
- Flowers T.J., Hajibagheri M.A., Yeo A.R.** (1991) Ion accumulation in the cell walls of rice plants growing under saline conditions: evidence for the Oertli hypothesis. *Plant, cell & environment* 14:319-325.
- Fobert P.R., Miki B.L., Iyer V.** (1991) Detection of gene regulatory signals in plants revealed by T-DNA-mediated fusions. *Plant molecular biology* 17:837-851.
- Foolad M.** (2004) Recent advances in genetics of salt tolerance in tomato. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 76:101-119.
- Foolad M.R.** (2007) Current status of breeding tomatoes for salt and drought tolerance, in: A. Matthew, *et al.*, (Eds.), *Advances in molecular breeding toward drought and salt tolerant crops*, Springer. pp. 669-700.
- Foolad M., Jones R.** (1993) Mapping salt-tolerance genes in tomato (*Lycopersicon esculentum*) using trait-based marker analysis. *Theoretical and Applied Genetics* 87:184-192.
- Foolad M., Lin G.** (1997) Absence of a genetic relationship between salt tolerance during seed germination and vegetative growth in tomato. *Plant Breeding* 116:363-367.
- Foolad M., Stoltz T., Dervinis C., Rodriguez R., Jones R.** (1997) Mapping QTLs conferring salt tolerance during germination in tomato by selective genotyping. *Molecular Breeding* 3:269-277.
- Fornara F., Panigrahi K.C., Gissot L., Sauerbrunn N., Rühl M., Jarillo J.A., Coupland G.** (2009) *Arabidopsis* DOF transcription factors act redundantly to reduce CONSTANS expression and are essential for a photoperiodic flowering response. *Developmental Cell* 17:75-86.
- Franklin-Tong V.E., Franklin F.** (2003) The different mechanisms of gametophytic self-incompatibility. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 358:1025-1032.
- Franzmann L.H., Yoon E.S., Meinke D.W.** (1995) Saturating the genetic map of *Arabidopsis thaliana* with embryonic mutations. *The Plant Journal* 7:341-350.
- Frary A., Keleş D., Pinar H., Göl D., Doğanlar S.** (2011) NaCl tolerance in *Lycopersicon pennellii* introgression lines: QTL related to physiological responses. *Biologia Plantarum* 55:461-468.
- Frary A., Göl D., Keleş D., Ökmen B., Pinar H., Şığva H.Ö., Yemenicioğlu A., Doğanlar S.** (2010) Salt tolerance in *Solanum pennellii*: antioxidant response and related QTL. *BMC Plant Biology* 10:58.
- Frary A., Nesbitt T.C., Frary A., Grandillo S., Van Der Knaap E., Cong B., Liu J., Meller J., Elber R., Alpert K.B.** (2000) *fw2.2*: a quantitative trait locus key to the evolution of

- tomato fruit size. *Science* 289:85-88.
- Fray R.G., Grierson D.** (1993) Identification and genetic analysis of normal and mutant phytoene synthase genes of tomato by sequencing, complementation and co-suppression. *Plant Molecular Biology* 22:589-602.
- Freytag A., Wrather J., Erichsen A.** (1990) Salt tolerant sugarbeet progeny from tissue cultures challenged with multiple salts. *Plant Cell Reports* 8:647-650.
- Fridman E., Pleban T., Zamir D.** (2000) A recombination hotspot delimits a wild-species quantitative trait locus for tomato sugar content to 484 bp within an invertase gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 97:4718-4723.
- Friedrichsen D., Chory J.** (2001) Steroid signaling in plants: from the cell surface to the nucleus. *Bioessays* 23:1028-1036.
- Fu X., Fontana S., Bong B.B., Tinjuangjun P., Sudhakar D., Twyman R.M., Christou P., Kohli A.** (2000) Linear transgene constructs lacking vector backbone sequences generate low-copy-number transgenic plants with simple integration patterns. *Transgenic Research* 9:11-19.
- Fujioka S., Yokota T.** (2003) Biosynthesis and metabolism of brassinosteroids. *Annual Review of Plant Biology* 54:137-164.
- Fujita M., Fujita Y., Noutoshi Y., Takahashi F., Narusaka Y., Yamaguchi-Shinozaki K., Shinozaki K.** (2006) Crosstalk between abiotic and biotic stress responses: a current view from the points of convergence in the stress signaling networks. *Current Opinion in Plant Biology* 9:436-442.
- Gallavotti A., Zhao Q., Kyozuka J., Meeley R.B., Ritter M.K., Doebley J.F., Enrico Pe M., Schmidt R.J.** (2004) The role of *barren stalk1* in the architecture of maize. *Nature* 432:630-635.
- Gálvez F.J., Baghour M., Hao G., Cagnac O., Rodríguez-Rosales M.P., Venema K.** (2012) Expression of LeNHX isoforms in response to salt stress in salt sensitive and salt tolerant tomato species. *Plant Physiology and Biochemistry* 51:109-115.
- García-Abellán J.O., Fernández-García N., López-Berenguer C., Egea I., Flores F.B., Angosto T., Capel J., Lozano R., Pineda B., Moreno V.** (2015) The tomato *res* mutant which accumulates JA in roots in non-stressed conditions restores cell structure alterations under salinity. *Physiologia Plantarum* 155:296-314.
- Garrido L.** (2009) Escrutinio de una colección de líneas transgénicas de tomate para la identificación de mutantes insercionales hipersensibles al estrés salino., Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos. Universidad Politécnica de Valencia, Valencia.
- Gaxiola R., de Larrinoa I.F., Villalba J., Serrano R.** (1992) A novel and conserved salt-induced protein is an important determinant of salt tolerance in yeast. *The EMBO journal* 11:3157.
- George E.F., Hall M.A., De Klerk G.-J.** (2008) The components of plant tissue culture media II: organic additions, osmotic and pH effects, and support systems, in E.F. George, *et al.* (Eds.), *Plant propagation by tissue culture*, Springer. pp. 115-173.
- Georgiady M.S., Lord E.M.** (2002) Evolution of the inbred flower form in the currant tomato, *Lycopersicon pimpinellifolium*. *International Journal of Plant Sciences* 163:531-541.
- Ghanem M.E., Albacete A., Martínez-Andújar C., Acosta M., Romero-Aranda R., Dodd I.C., Lutts S., Pérez-Alfocea F.** (2008) Hormonal changes during salinity-induced leaf senescence in tomato (*Solanum lycopersicum* L.). *Journal of Experimental Botany* 59:3039-3050.
- Ghanem M.E., van Elteren J., Albacete A., Quinet M., Martínez-Andújar C., Kinet J.-M.,**

- Pérez-Alfocea F., Lutts S.** (2009) Impact of salinity on early reproductive physiology of tomato (*Solanum lycopersicum*) in relation to a heterogeneous distribution of toxic ions in flower organs. *Functional Plant Biology* 36:125-136.
- Ghassemi F., Jakeman A.J., Nix H.A.** (1995) Salinisation of land and water resources: human causes, extent, management and case studies. CAB International, Wallingford, UK.
- Gidoni D., Fuss E., Burbidge A., Speckmann G., James S., Nijkamp D., Mett A., Feiler J., Smoker M., de Vroomen M.** (2003) Multi-functional T-DNA/Ds tomato lines designed for gene cloning and molecular and physical dissection of the tomato genome. *Plant Molecular Biology* 51:83-98.
- Gillaspy G., Ben-David H., Gruissem W.** (1993) Fruits: a developmental perspective. *The Plant Cell* 5:1439.
- Giménez E., Pineda B., Capel J., Antón M.T., Atarés A., Pérez-Martín F., García-Sogo B., Angosto T., Moreno V., Lozano R.** (2010) Functional analysis of the Arlequin mutant corroborates the essential role of the Arlequin/TAGL1 gene during reproductive development of tomato. *PLoS One* 5:e144277.
- Gisbert C., Arrillaga I., Roig L., Moreno V.** (1999) Acquisition of a collection of *Lycopersicon pennellii* (Corr. D'Arcy) transgenic plants with uidA and nptII marker genes. *Journal of Horticultural Science & Biotechnology* 74:105-109.
- Gisbert C., Rus A.M., Bolarín M.C., López-Coronado J.M., Arrillaga I., Montesinos C., Caro M., Serrano R., Moreno V.** (2000) The yeast HAL1 gene improves salt tolerance of transgenic tomato. *Plant Physiology* 123:393-402.
- Goergen G.** (2016) Generación de líneas T-DNA de tomate (*Solanum lycopersicum* L.), identificación de mutantes de inserción afectados en caracteres del desarrollo y caracterización de mutantes de fruto partenocárpico. Universitat Politècnica de València Valencia.
- Goffreda J., Mutschler M.** (1989) Inheritance of potato aphid resistance in hybrids between *Lycopersicon esculentum* and *L. pennellii*. *Theoretical and Applied Genetics* 78:210-216.
- Goodrich J., Puansomlee P., Martin M., Long D., Coupland G.** (1997) A polycomb-group gene regulates homeotic gene expression in *Arabidopsis*. *Nature* 386:44-51.
- Gould K., McKelvie J., Markham K.** (2002) Do anthocyanins function as antioxidants in leaves? Imaging of H₂O₂ in red and green leaves after mechanical injury. *Plant, Cell & Environment* 25:1261-1269.
- Grattan S., Grieve C.** (1998) Salinity–mineral nutrient relations in horticultural crops. *Scientia Horticulturae* 78:127-157.
- Gray W.M., del Pozo J.C., Walker L., Hobbie L., Risseeuw E., Banks T., Crosby W.L., Yang M., Ma H., Estelle M.** (1999) Identification of an SCF ubiquitin–ligase complex required for auxin response in *Arabidopsis thaliana*. *Genes & Development* 13:1678-1691.
- Greenblatt I.M.** (1984) A chromosome replication pattern deduced from pericarp phenotypes resulting from movements of the transposable element, Modulator, in maize. *Genetics* 108:471-485.
- Grove M.D., Spencer G.F., Rohwedder W.K., Mandava N., Worley J.F., Warthen J.D., Steffens G.L., Flippen-Anderson J.L., Cook J.C.** (1979) Brassinolide, a plant growth-promoting steroid isolated from *Brassica napus* pollen. *Nature* 281: 216-217
- Gruszka D.** (2013) The brassinosteroid signaling pathway—new key players and interconnections with other signaling networks crucial for plant development and stress tolerance. *International Journal of Molecular Sciences* 14:8740-8774.

- Gu Q., Ferrándiz C., Yanofsky M.F., Martienssen R.** (1998) The FRUITFULL MADS-box gene mediates cell differentiation during *Arabidopsis* fruit development. *Development* 125:1509-1517.
- Guan L., Murphy A.S., Peer W.A., Gan L., Li Y., Cheng Z.-M.**(2015) Physiological and molecular regulation of adventitious root formation. *Critical Reviews in Plant Sciences* 34:506-521.
- Gutterson N., Reuber T.L.** (2004) Regulation of disease resistance pathways by AP2/ERF transcription factors. *Current Opinion in Plant Biology* 7:465-471.
- Hajjar R., Hodgkin T.** (2007) The use of wild relatives in crop improvement: a survey of developments over the last 20 years. *Euphytica* 156:1-13.
- Halfter U., Ishitani M., Zhu J.-K.** (2000) The *Arabidopsis* SOS2 protein kinase physically interacts with and is activated by the calcium-binding protein SOS3. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 97:3735-3740.
- Han M.-J., Jung K.-H., Yi G., Lee D.-Y., An G.** (2006) Rice Immature Pollen 1 (RIP1) is a regulator of late pollen development. *Plant and Cell Physiology* 47:1457-1472.
- Hancock N.C., Kent L., McClure B.A.** (2005) The stylar 120 kDa glycoprotein is required for S-specific pollen rejection in *Nicotiana*. *The Plant Journal* 43:716-723.
- Hardon J.** (1967) Unilateral incompatibility between *Solanum pennellii* and *Lycopersicon esculentum*. *Genetics* 57:795.
- Hare P., Cress W., Van Staden J.** (1998) Dissecting the roles of osmolyte accumulation during stress. *Plant, Cell & Environment* 21:535-553.
- Harrison E.J., Bush M., Plett J.M., McPhee D.P., Vitez R., O'Malley B., Sharma V., Bosnich W., Seguin A., MacKay J.** (2007) Diverse developmental mutants revealed in an activation-tagged population of poplar. *Botany* 85:1071-1081.
- Hasegawa P.M., Bressan R.A., Zhu J.-K., Bohnert H.J.** (2000) Plant cellular and molecular responses to high salinity. *Annual Review of Plant Biology* 51:463-499.
- Haubrick L., Assmann S.** (2006) Brassinosteroids and plant function: some clues, more puzzles. *Plant, Cell & Environment* 29:446-457.
- Haupt-Herting S., Klug K., Fock H.P.** (2001) A new approach to measure gross CO₂ fluxes in leaves. Gross CO₂ assimilation, photorespiration, and mitochondrial respiration in the light in tomato under drought stress. *Plant Physiology* 126:388-396.
- Hayashi H., Czaja I., Lubenow H., Schell J., Walden R.** (1992) Activation of a plant gene by T-DNA tagging: auxin-independent growth *in vitro*. *Science* 258:1350-1353.
- Hayat S., Hasan S.A., Yusuf M., Hayat Q., Ahmad A.** (2010) Effect of 28-homobrassinolide on photosynthesis, fluorescence and antioxidant system in the presence or absence of salinity and temperature in *Vigna radiata*. *Environmental and Experimental Botany* 69:105-112.
- Hayward H., Long E.** (1943) Some effects of sodium salts on the growth of the tomato. *Plant Physiology* 18:556.
- Hazarika B.N.** (2006) Morpho-physiological disorders in *in vitro* culture of plants. *Scientia Horticulturae* 108:105-120.
- He Y., Tang W., Swain J.D., Green A.L., Jack T.P., Gan S.** (2001) Networking senescence-regulating pathways by using *Arabidopsis* enhancer trap lines. *Plant Physiology* 126:707-716.
- He X.J., Mu R.L., Cao W.H., Zhang Z.G., Zhang J.S., Chen S.Y.** (2005) AtNAC2, a transcription factor downstream of ethylene and auxin signaling pathways, is involved in salt stress response and lateral root development. *The Plant Journal* 44:903-916.
- Hehl R., Baker B.** (1990) Properties of the maize transposable element Activator in

- transgenic tobacco plants: a versatile inter-species genetic tool. *The Plant Cell Online* 2:709-721.
- Helariutta Y., Fukaki H., Wysocka-Diller J., Nakajima K., Jung J., Sena G., Hauser M.-T., Benfey P.N.** (2000) The SHORT-ROOT gene controls radial patterning of the *Arabidopsis* root through radial signaling. *Cell* 101:555-567.
- Helliwell C.A., Chin-Atkins A.N., Wilson I.W., Chapple R., Dennis E.S., Chaudhury A.** (2001) The *Arabidopsis* AMP1 gene encodes a putative glutamate carboxypeptidase. *The Plant Cell* 13:2115-2125.
- Herman L., Jacobs A., Van Montagu M., Depicker A.** (1990) Plant chromosome/marker gene fusion assay for study of normal and truncated T-DNA integration events. *Molecular and General Genetics* 224:248-256.
- Hernández I., Alegre L., Van Breusegem F., Munné-Bosch S.** (2009) How relevant are flavonoids as antioxidants in plants? *Trends in Plant Science* 14:125-132.
- Heuvelink E., Buiscool R.** (1995) Influence of sink-source interaction on dry matter production in tomato. *Annals of Botany* 75:381-389.
- Hirayama T., Shinozaki K.** (2010) Research on plant abiotic stress responses in the post-genome era: Past, present and future. *The Plant Journal* 61:1041-1052.
- Hirochika H., Sugimoto K., Otsuki Y., Tsugawa H., Kanda M.** (1996) Retrotransposons of rice involved in mutations induced by tissue culture. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 93:7783-7788.
- Ho L., Belda R., Brown M., Andrews J., Adams P.** (1993) Uptake and transport of calcium and the possible causes of blossom-end rot in tomato. *Journal of Experimental Botany* 44:509-518.
- Hobbie L., Estelle M.** (1995) The *axr4* auxin-resistant mutants of *Arabidopsis thaliana* define a gene important for root gravitropism and lateral root initiation. *The Plant Journal* 7:211-220.
- Holton N., Caño-Delgado A., Harrison K., Montoya T., Chory J., Bishop G.J.** (2007) Tomato BRASSINOSTEROID INSENSITIVE1 is required for systemin-induced root elongation in *Solanum pimpinellifolium* but is not essential for wound signaling. *The Plant Cell* 19:1709-1717.
- Holtorf H., Guitton M.-C., Reski R.** (2002) Plant functional genomics. *Naturwissenschaften* 89:235-249.
- Horsch R., Fraley R., Rogers S., Sanders P., Lloyd A.** (1984) Inheritance of functional foreign genes in plants [Genetic engineering with T-DNA from *Agrobacterium tumefaciens*, *Nicotiana plumbaginifolia*]. *Science* 223:496-498.
- Houimli S.I.M., Denden M., El Hadj S.B.** (2008) Induction of salt tolerance in pepper (*Capsicum annuum*) by 24-epibrassinolide. *EurAsian Journal of BioSciences* 2:83-90.
- Hsiao T.C., Xu L.K.** (2000) Sensitivity of growth of roots versus leaves to water stress: biophysical analysis and relation to water transport. *Journal of Experimental Botany* 51:1595-1616.
- Hsu S., Hsu Y., Kao C.** (2003) The effect of polyethylene glycol on proline accumulation in rice leaves. *Biologia Plantarum* 46:73-78.
- Hughes N.M., Carpenter K.L., Cannon J.G.** (2013) Estimating contribution of anthocyanin pigments to osmotic adjustment during winter leaf reddening. *Journal of Plant Physiology* 170:230-233.
- Husaini A.M., Abdin M.Z.** (2008) Development of transgenic strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch.) plants tolerant to salt stress. *Plant Science* 174:446-455.
- Igic B., Smith W., Robertson K., Schaal B., Kohn J.** (2007) Studies of self-incompatibility in

- wild tomatoes: I. S-allele diversity in *Solanum chilense* Dun.(Solanaceae). *Heredity* 99:553-561.
- Inan G., Goto F., Jin J.B., Rosado A., Koiwa H., Shi H., Hasegawa P.M., Bressan R.A., Maggio A., Li X.** (2007) Isolation and characterization of *shs1*, a sugar-hypersensitive and ABA-insensitive mutant with multiple stress responses. *Plant Molecular Biology* 65:295-309.
- Iyer-Pascuzzi A.S., Jackson T., Cui H., Petricka J.J., Busch W., Tsukagoshi H., Benfey P.N.** (2011) Cell identity regulators link development and stress responses in the *Arabidopsis* root. *Developmental Cell* 21:770-782.
- Jackson M., Abbott A., Belcher A., Hall K., Butler R., Cameron J.** (1991) Ventilation in plant tissue cultures and effects of poor aeration on ethylene and carbon dioxide accumulation, oxygen depletion and explant development. *Annals of Botany* 67:229-237.
- Jaillais Y., Hothorn M., Belkhadir Y., Dabi T., Nimchuk Z.L., Meyerowitz E.M., Chory J.** (2011) Tyrosine phosphorylation controls brassinosteroid receptor activation by triggering membrane release of its kinase inhibitor. *Genes & Development* 25:232-237.
- Jain S.M.** (2001) Tissue culture-derived variation in crop improvement. *Euphytica* 118:153-166.
- Jain R., Jain S., Nainawatee H., Chowdhury J.** (1990) Salt-tolerance in *Brassica juncea* L.I. *In vitro* selection, agronomic evaluation and genetic stability. *Euphytica* 48:141-152.
- Jefferson R.A., Kavanagh T.A., Bevan M.W.** (1987) GUS fusions: beta-glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *The EMBO journal* 6:3901.
- Jeon J.S., Lee S., Jung K.H., Jun S.H., Jeong D.H., Lee J., Kim C., Jang S., Lee S., Yang K.** (2000) T-DNA insertional mutagenesis for functional genomics in rice. *The Plant Journal* 22:561-570.
- Jeong D.-H., An S., Kang H.-G., Moon S., Han J.-J., Park S., Lee H.S., An K., An G.** (2002) T-DNA insertional mutagenesis for activation tagging in rice. *Plant Physiology* 130:1636-1644.
- Jiang K., Feldman L.J.** (2005) Regulation of root apical meristem development. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 21:485-509.
- Johnson X., Brcich T., Dun E.A., Goussot M., Haurogné K., Beveridge C.A., Rameau C.** (2006) Branching genes are conserved across species. Genes controlling a novel signal in pea are coregulated by other long-distance signals. *Plant Physiology* 142:1014-1026.
- Jones R.** (1986) High salt tolerance potential in *Lycopersicon* species during germination. *Euphytica* 35:575-582.
- Jones B., Ljung K.** (2012) Subterranean space exploration: the development of root system architecture. *Current Opinion in Plant Biology* 15:97-102.
- Jones J., Carland F., Lim E., Ralston E., Dooner H.K.** (1990) Preferential transposition of the maize element Activator to linked chromosomal locations in tobacco. *The Plant Cell Online* 2:701-707.
- Jones D.A., Thomas C.M., Hammond-Kosack K.E., Balint-Kurti P.J., Jones J.** (1994) Isolation of the tomato Cf-9 gene for resistance to *Cladosporium fulvum* by transposon tagging. *Science* 266:789-793.
- Juadjur A., Mohn C., Schantz M., Baum M., Winterhalter P., Richling E.** (2015) Fractionation of an anthocyanin-rich bilberry extract and *in vitro* antioxidative activity testing. *Food Chemistry* 167:418-424.
- Jung J., McCouch S.** (2013) Getting to the roots of it: Genetic and hormonal control of root

- architecture. *Frontiers in Plant Science* 4.
- Jung K.-H., Hur J., Ryu C.-H., Choi Y., Chung Y.-Y., Miyao A., Hirochika H., An G.** (2003) Characterization of a rice chlorophyll-deficient mutant using the T-DNA gene-trap system. *Plant and Cell Physiology* 44:463-472.
- Jung K.-H., Han M.-J., Lee Y.-S., Kim Y.-W., Hwang I., Kim M.-J., Kim Y.-K., Nahm B.H., An G.** (2005) Rice *Undeveloped Tapetum1* is a major regulator of early tapetum development. *The Plant Cell Online* 17:2705-2722.
- Jung K.-H., Han M.-J., Lee D.-y., Lee Y.-S., Schreiber L., Franke R., Faust A., Yephremov A., Saedler H., Kim Y.-W.** (2006) *Wax-deficient anther1* is involved in cuticle and wax production in rice anther walls and is required for pollen development. *The Plant Cell Online* 18:3015-3032.
- Kagale S., Divi U.K., Krochko J.E., Keller W.A., Krishna P.** (2007) Brassinosteroid confers tolerance in *Arabidopsis thaliana* and *Brassica napus* to a range of abiotic stresses. *Planta* 225:353-364.
- Kahn T.L., Fender S.E., Bray E.A., O'Connell M.A.** (1993) Characterization of expression of drought- and abscisic acid-regulated tomato genes in the drought-resistant species *Lycopersicon pennellii*. *Plant Physiology* 103:597-605.
- Kamenetzky L., Asís R., Bassi S., de Godoy F., Bermudez L., Fernie A.R., Van Sluys M.-A., Vrebalov J., Giovannoni J.J., Rossi M.** (2010) Genomic analysis of wild tomato introgressions determining metabolism-and yield-associated traits. *Plant Physiology* 152:1772-1786.
- Kao T.-h., Tsukamoto T.** (2004) The molecular and genetic bases of S-RNase-based self-incompatibility. *The Plant Cell* 16:S72-S83.
- Karaba A., Dixit S., Greco R., Aharoni A., Trijatmiko K.R., Marsch-Martinez N., Krishnan A., Nataraja K.N., Udayakumar M., Pereira A.** (2007) Improvement of water use efficiency in rice by expression of HARDY, an *Arabidopsis* drought and salt tolerance gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104:15270-15275.
- Kareem A., Durgaprasad K., Sugimoto K., Du Y., Pulianmackal A.J., Trivedi Z.B., Abhayadev P.V., Pinon V., Meyerowitz E.M., Scheres B.** (2015) PLETHORA genes control regeneration by a two-step mechanism. *Current Biology* 25:1017-1030.
- Kawasaki S., Borchert C., Deyholos M., Wang H., Brazille S., Kawai K., Galbraith D., Bohnert H.J.** (2001) Gene expression profiles during the initial phase of salt stress in rice. *The Plant Cell* 13:889-905.
- Kay R., Chan A., Daly M., McPherson J.** (1987) Duplication of CaMV 35S promoter sequences creates a strong enhancer for plant genes. *Science* 236:1299-1302.
- Kazan K., Lyons R.** (2015) The link between flowering time and stress tolerance. *Journal of Experimental Botany* 67:47-60.
- Kebrom T.H., Spielmeier W., Finnegan E.J.** (2013) Grasses provide new insights into regulation of shoot branching. *Trends in Plant Science* 18:41-48.
- Keddie J.S., Carroll B., Jones J., Gruissem W.** (1996) The DCL gene of tomato is required for chloroplast development and palisade cell morphogenesis in leaves. *The EMBO journal* 15:4208.
- Keddie J.S., Carroll B.J., Thomas C.M., Reyes M.E., Klimyuk V., Holtan H., Gruissem W., Jones J.D.** (1998) Transposon tagging of the *Defective embryo and meristems* gene of tomato. *The Plant Cell Online* 10:877-887.
- Keller J., Lim E., Dooner H.** (1993) Preferential transposition of Ac to linked sites in *Arabidopsis*. *Theoretical and Applied Genetics* 86:585-588.
- Kertbundit S., De Greve H., Deboeck F., Van Montagu M., Hernalsteens J.-P.** (1991) *In*

- vivorandom beta-glucuronidase gene fusions in *Arabidopsis thaliana*. Proceedings of the National Academy of Sciences 88:5212-5216.
- Khatun S., Flowers T.** (1995) Effects of salinity on seed set in rice. *Plant, Cell & Environment* 18:61-67.
- Khripach V., Zhabinskii V., de Groot A.** (2000) Twenty years of brassinosteroids: steroidal plant hormones warrant better crops for the XXI century. *Annals of Botany* 86:441-447.
- Kijne J.W., Barker R., Molden D.J.** (2003) Water productivity in agriculture: limits and opportunities for improvement. CAB International, Wallingford, UK.
- Kim S.-G., Kim S.-Y., Park C.-M.** (2007) A membrane-associated NAC transcription factor regulates salt-responsive flowering via FLOWERING LOCUS T in *Arabidopsis*. *Planta* 226:647-654.
- Kim T.-W., Guan S., Sun Y., Deng Z., Tang W., Shang J.-X., Sun Y., Burlingame A.L., Wang Z.-Y.** (2009) Brassinosteroid signal transduction from cell-surface receptor kinases to nuclear transcription factors. *Nature Cell Biology* 11:1254-1260.
- Kim W.-Y., Ali Z., Park H.J., Park S.J., Cha J.-Y., Perez-Hormaeche J., Quintero F.J., Shin G., Kim M.R., Qiang Z.** (2013) Release of SOS2 kinase from sequestration with GIGANTEA determines salt tolerance in *Arabidopsis*. *Nature Communications* 4:1352.
- Kinet J.M.** (1977) Effect of light conditions on the development of the inflorescence in tomato. *Scientia Horticulturae* 6:15-26.
- Kinet J.M., Peet M.** (1997) Tomato, in: H. Wien (Ed.), *The physiology of vegetable crops*, CAB International, Wallingford, UK. pp 207-258.
- King J.J., Stimart D.P., Fisher R.H., Bleecker A.B.** (1995) A mutation altering auxin homeostasis and plant morphology in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 7:2023-2037.
- Klimyuk V., Nussaume L., Harrison K., Jones J.** (1995) Novel GUS expression patterns following transposition of an enhancer trap Ds element in *Arabidopsis*. *Molecular and General Genetics* 249:357-365.
- Knapp S., Coupland G., Uhrig H., Starlinger P., Salamini F.** (1988) Transposition of the maize transposable element Ac in *Solanum tuberosum*. *Molecular and General Genetics* 213:285-290.
- Koca H., Ozdemir F., Turkan I.** (2006) Effect of salt stress on lipid peroxidation and superoxide dismutase and peroxidase activities of *Lycopersicon esculentum* and *L. pennellii*. *Biologia Plantarum* 50:745-748.
- Koh S., Lee S.-C., Kim M.-K., Koh J.H., Lee S., An G., Choe S., Kim S.-R.** (2007) T-DNA tagged knockout mutation of rice OsGSK1, an orthologue of *Arabidopsis* BIN2, with enhanced tolerance to various abiotic stresses. *Plant Molecular Biology* 65:453-466.
- Koka C.V., Cerny R.E., Gardner R.G., Noguchi T., Fujioka S., Takatsuto S., Yoshida S., Clouse S.D.** (2000) A putative role for the tomato genes DUMPY and CURL-3 in brassinosteroid biosynthesis and response. *Plant Physiology* 122:85-98.
- Koltai H., LekKala S.P., Bhattacharya C., Mayzlish-Gati E., Resnick N., Winer S., Dor E., Yoneyama K., Yoneyama K., Hershenhorn J., Joel D.M., Kapulnik Y.** (2010) A tomato strigolactone-impaired mutant displays aberrant shoot morphology and plant interactions. *Journal of Experimental Botany* 61:1739-1749.
- Koncz C., Martini N., Mayerhofer R., Koncz-Kalman Z., Körber H., Redei G.P., Schell J.** (1989) High-frequency T-DNA-mediated gene tagging in plants. Proceedings of the National Academy of Sciences 86:8467-8471.
- Kondo K., Yamamoto M., Itahashi R., Sato T., Egashira H., Hattori T., Kowiyama Y.** (2002) Insights into the evolution of self-compatibility in *Lycopersicon* from a study of stylar

- factors. *The Plant Journal* 30:143-153.
- Kononov M.E., Bassuner B., Gelvin S.B.** (1997) Integration of T-DNA binary vector 'backbone' sequences into the tobacco genome: evidence for multiple complex patterns of integration. *The Plant Journal* 11:945-957.
- Kovinich N., Kayanja G., Chanoca A., Otegui M.S., Grotewold E.** (2015) Abiotic stresses induce different localizations of anthocyanins in *Arabidopsis*. *Plant signaling & Behavior* 10:e1027850.
- Kowyama Y., Kunz C., Lewis I., Newbigin E., Clarke A., Anderson M.** (1994) Self-compatibility in a *Lycopersicon peruvianum* variant (LA2157) is associated with a lack of style S-RNase activity. *Theoretical and Applied Genetics* 88:859-864.
- Kurepa J., Smalle J., Va M., Montagu N., Inzé D.** (1998) Oxidative stress tolerance and longevity in *Arabidopsis*: the late-flowering mutant gigantea is tolerant to paraquat. *The Plant Journal* 14:759-764.
- Kuromori T., Takahashi S., Kondou Y., Shinozaki K., Matsui M.** (2009) Phenome analysis in plant species using loss-of-function and gain-of-function mutants. *Plant and Cell Physiology* 50:1215-1231.
- Labate J.A., Grandillo S., Fulton T., Muños S., Caicedo A.L., Peralta I., Ji Y., Chetelat R.T., Scott J., Gonzalo M.J.** (2007) *Tomato, Vegetables*, Springer. pp. 1-125.
- Landi M., Tattini M., Gould K.S.** (2015) Multiple functional roles of anthocyanins in plant-environment interactions. *Environmental and Experimental Botany* 119:4-17.
- Lanfermeijer F., Dijkhuis J., Sturre M.G., de Haan P., Hille J.** (2003) Cloning and characterization of the durable tomato mosaic virus resistance gene Tm-22 from *Lycopersicon esculentum*. *Plant molecular biology* 52:1039-1051.
- Laufs P., Autran D., Traas J.** (1999) A chromosomal paracentric inversion associated with T-DNA integration in *Arabidopsis*. *The Plant Journal* 18:131-139.
- Lawlor D.W.** (2013) Genetic engineering to improve plant performance under drought: physiological evaluation of achievements, limitations, and possibilities. *Journal of Experimental Botany* 64:83-108.
- Lebrun L., Rajasekaran K., Mullins M.** (1985) Selection *in vitro* for NaCl-tolerance in *Vitis rupestris* Scheele. *Annals of Botany* 56:733-740.
- Ledoux L.** (1965) Uptake of DNA by Living Cells, in: J. N. Davidson and E. C. Waldo (Eds.), *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology*, Academic Press. pp. 231-267.
- Lee M.-K., Kim H.-S., Kim J.-S., Kim S.-H., Park Y.-D.** (2004) *Agrobacterium*-mediated transformation system for large-scale production of transgenic chinese cabbage (*Brassica rapa* L. ssp. *pekinensis*) plants for insertional mutagenesis. *Journal of Plant Biology* 47:300-306.
- Lee O.N., Uchida Y., Nemoto K., Mine Y., Sugiyama N.** (2015) Quantitative trait loci analysis of lateral shoot growth in tomato. *Scientia Horticulturae* 192:117-124.
- Lee C.-Y., Agrawal D.C., Wang C.-S., Yu S.-M., Chen J.J., Tsay H.-S.** (2008) T-DNA activation tagging as a tool to isolate *Salvia miltiorrhiza* transgenic lines for higher yields of tanshinones. *Planta Medica* 74:780.
- Lee S., Jeon U.S., Lee S.J., Kim Y.-K., Persson D.P., Husted S., Schjørring J.K., Kakei Y., Masuda H., Nishizawa N.K.** (2009) Iron fortification of rice seeds through activation of the nicotianamine synthase gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106:22014-22019.
- Lee Y.S., Jeong D.H., Lee D.Y., Yi J., Ryu C.H., Kim S.L., Jeong H.J., Choi S.C., Jin P., Yang J.** (2010) OsCOL4 is a constitutive flowering repressor upstream of Ehd1 and

- downstream of OsphyB. *The Plant Journal* 63:18-30.
- Lee H.E., Shin D., Park S.R., Han S.-E., Jeong M.-J., Kwon T.-R., Lee S.-K., Park S.-C., Yi B.Y., Kwon H.-B., Byun M.-O.** (2007) Ethylene responsive element binding protein 1 (StEREBP1) from *Solanum tuberosum* increases tolerance to abiotic stress in transgenic potato plants. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 353:863-868.
- Leoni C., Volpicella M., De Leo F., Gallerani R., Ceci L.R.** (2011) Genome walking in eukaryotes. *Febs Journal* 278:3953-3977.
- Levy Y.Y., Dean C.** (1998) The Transition to Flowering. *The Plant Cell* 10:1973-1989.
- Li J., Chory J.** (1997) A putative leucine-rich repeat receptor kinase involved in brassinosteroid signal transduction. *Cell* 90:929-938.
- Li C.J., Bangerth F.** (1999) Autoinhibition of indoleacetic acid transport in the shoots of two-branched pea (*Pisum sativum*) plants and its relationship to correlative dominance. *Physiologia Plantarum* 106:415-420.
- Li J., Nam K.H.** (2002) Regulation of brassinosteroid signaling by a GSK3/SHAGGY-like kinase. *Science* 295:1299-1301.
- Li W., Chetelat R.T.** (2014) The role of a pollen-expressed cullin1 Protein in gametophytic self-incompatibility in *Solanum*. *Genetics* 196:439-442.
- Li W., Chetelat R.T.** (2015) Unilateral incompatibility gene *ui1.1* encodes an S-locus F-box protein expressed in pollen of *Solanum* species. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 112:4417-4422.
- Li S.-W., Xue L., Xu S., Feng H., An L.** (2009) Mediators, genes and signaling in adventitious rooting. *The Botanical Review* 75:230-247.
- Li J., Wen J., Lease K.A., Doke J.T., Tax F.E., Walker J.C.** (2002) BAK1, an *Arabidopsis* LRR receptor-like protein kinase, interacts with BRI1 and modulates brassinosteroid signaling. *Cell* 110:213-222.
- Li K., Wang Y., Han C., Zhang W., Jia H., Li X.** (2007) GA signaling and CO/FT regulatory module mediate salt-induced late flowering in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Growth Regulation* 53:195-206.
- Li Z.-Y., Xu Z.-S., He G.-Y., Yang G.-X., Chen M., Li L.-C., Ma Y.-Z.** (2012) A mutation in *Arabidopsis* BSK5 encoding a brassinosteroid-signaling kinase protein affects responses to salinity and abscisic acid. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 426:522-527.
- Li J., Liu L., Bai Y., Zhang P., Finkers R., Du Y., Visser R.G., van Heusden A.W.** (2011) Seedling salt tolerance in tomato. *Euphytica* 178:403-414.
- Lifschitz E., Eshed Y.** (2006) Universal florigenic signals triggered by FT homologues regulate growth and flowering cycles in perennial day-neutral tomato. *Journal of Experimental Botany* 57:3405-3414.
- Lin T., Zhu G., Zhang J., Xu X., Yu Q., Zheng Z., Zhang Z., Lun Y., Li S., Wang X.** (2014) Genomic analyses provide insights into the history of tomato breeding. *Nature Genetics* 46:1220-1226.
- Lindsey K., Wei W., Clarke M., McArdle H., Rooke L., Topping J.** (1993) Tagging genomic sequences that direct transgene expression by activation of a promoter trap in plants. *Transgenic Research* 2:33-47.
- Lippman Z.B., Semel Y., Zamir D.** (2007) An integrated view of quantitative trait variation using tomato interspecific introgression lines. *Current Opinion in Genetics & Development* 17:545-552.
- Lippman Z.B., Cohen O., Alvarez J.P., Abu-Abied M., Pekker I., Paran I., Eshed Y., Zamir**

- D.(2008) The making of a compound inflorescence in tomato and related nightshades. *PLoS Biol* 6:e288.
- Liu K.-B., Li S.-X.** (1989) *In-vitro* flower formation in leaf explants of tomato: effect of NaCl. *Planta* 180:131-133.
- Liu J., Zhu J.-K.** (1997) An *Arabidopsis* mutant that requires increased calcium for potassium nutrition and salt tolerance. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 94:14960-14964.
- Liu J., Van Eck J., Cong B., Tanksley S.D.** (2002) A new class of regulatory genes underlying the cause of pear-shaped tomato fruit. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99:13302-13306.
- Liu P.-P., Koizuka N., Homrichhausen T.M., Hewitt J.R., Martin R.C., Nonogaki H.** (2005) Large-scale screening of *Arabidopsis* enhancer-trap lines for seed germination-associated genes. *The Plant Journal* 41:936-944.
- Lombardi-Crestana S., da Silva Azevedo M., e Silva G.F.F., Pino L.E., Appezzato-da-Glória B., Figueira A., Nogueira F.T.S., Peres L.E.P.** (2012) The tomato (*Solanum lycopersicum* cv. Micro-Tom) natural genetic variation Rg1 and the DELLA mutant *procera* control the competence necessary to form adventitious roots and shoots. *Journal of Experimental Botany* 63:5689-5703.
- Lopez M., Satti S.** (1996) Calcium and potassium-enhanced growth and yield of tomato under sodium chloride stress. *Plant Science* 114:19-27.
- Lorković Z.J.** (2009) Role of plant RNA-binding proteins in development, stress response and genome organization. *Trends in Plant Science* 14:229-236.
- Lozano R., Giménez E., Cara B., Capel J., Angosto T.** (2009) Genetic analysis of reproductive development in tomato. *International Journal of Developmental Biology* 53:1635.
- Luckwill L.C.** (1943) *The Genus Lycopersicon: An Historical, Biological, and Taxonomic Survey of the Wild and Cultivated Tomatoes.* The University Press.
- Lugan R., Niogret M.F., Leport L., Guégan J.P., Larher F.R., Savouré A., Kopka J., Bouchereau A.** (2010) Metabolome and water homeostasis analysis of *Thellungiella salsuginea* suggests that dehydration tolerance is a key response to osmotic stress in this halophyte. *The Plant Journal* 64:215-229.
- Lutts S., Kinet J., Bouharmont J.** (1995) Changes in plant response to NaCl during development of rice (*Oryza sativa* L.) varieties differing in salinity resistance. *Journal of Experimental Botany* 46:1843-1852.
- Lutts S., Kinet J., Bouharmont J.** (1998) NaCl impact on somaclonal variation exhibited by tissue culture-derived fertile plants of rice (*Oryza sativa* L.). *Journal of Plant Physiology* 152:92-103.
- Ma X., Qiao Z., Chen D., Yang W., Zhou R., Zhang W., Wang M.** (2015) CYCLIN-DEPENDENT KINASE G2 regulates salinity stress response and salt mediated flowering in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Molecular Biology* 88:287-299.
- Maas E., Poss J.** (1989) Salt sensitivity of wheat at various growth stages. *Irrigation Science* 10:29-40.
- Maggio A., Raimondi G., Martino A., De Pascale S.** (2007) Salt stress response in tomato beyond the salinity tolerance threshold. *Environmental and Experimental Botany* 59:276-282.
- Malamy J.** (2005) Intrinsic and environmental response pathways that regulate root system architecture. *Plant, Cell & Environment* 28:67-77.
- Malamy J.E., Benfey P.N.** (1997) Organization and cell differentiation in lateral roots of *Arabidopsis thaliana*. *Development* 124:33-44.

- Maniatis T., Fritsch E.t., Sambrook J., Engel J.** (1985) Molecular cloning—A laboratory manual. New York: Cold Spring Harbor Laboratory. Wiley Online Library.p 104.
- Mamidala P., Nanna R.S.** (2009) Influence of antibiotics on regeneration efficiency in tomato. *Plant Omics* 2:135-140.
- Mao L., Begum D., Chuang H.-w., Budiman M.A., Szymkowiak E.J., Irish E.E., Wing R.A.** (2000) JOINTLESS is a MADS-box gene controlling tomato flower abscission zone development. *Nature* 406:910-913.
- Mare C., Mazzucotelli E., Crosatti C., Francia E., Cattivelli L.** (2004) Hv-WRKY38: a new transcription factor involved in cold-and drought-response in barley. *Plant Molecular Biology* 55:399-416.
- Maron L.G., Guimarães C.T., Kirst M., Albert P.S., Birchler J.A., Bradbury P.J., Buckler E.S., Coluccio A.E., Danilova T.V., Kudrna D.** (2013) Aluminum tolerance in maize is associated with higher MATE1 gene copy number. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110:5241-5246.
- Martin B., Thorstenson Y.R.** (1988) Stable carbon isotope composition ($\delta^{13}C$), water use efficiency, and biomass productivity of *Lycopersicon esculentum*, *Lycopersicon pennellii*, and the F1 hybrid. *Plant Physiology* 88:213-217.
- Martinez-Rodriguez M.M., Estañ M.T., Moyano E., Garcia-Abellan J., Flores F., Campos J., Al-Azzawi M., Flowers T., Bolarín M.** (2008) The effectiveness of grafting to improve salt tolerance in tomato when an 'excluder' genotype is used as scion. *Environmental and Experimental Botany* 63:392-401.
- Martín-Trillo M., Cubas P.** (2010) TCP genes: a family snapshot ten years later. *Trends in Plant Science* 15:31-39.
- Martín-Trillo M., Grandío E.G., Serra F., Marcel F., Rodríguez-Buey M.L., Schmitz G., Theres K., Bendahmane A., Dopazo H., Cubas P.** (2011) Role of tomato BRANCHED1-like genes in the control of shoot branching. *The Plant Journal* 67:701-714.
- Mathews H., Clendennen S.K., Caldwell C.G., Liu X.L., Connors K., Matheis N., Schuster D.K., Menasco D., Wagoner W., Lightner J.** (2003) Activation tagging in tomato identifies a transcriptional regulator of anthocyanin biosynthesis, modification, and transport. *The Plant Cell* 15:1689-1703.
- May M.J., Vernoux T., Leaver C., Van Montagu M., Inzé D.** (1998) Glutathione homeostasis in plants: implications for environmental sensing and plant development. *Journal of Experimental Botany* 49:649-667.
- McClintock B.** (1950) The origin and behavior of mutable loci in maize. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 36:344-355.
- McClure B.A., Haring V., Ebert P.R., Anderson M.A., Simpson R.J., Sakiyama F., Clarke A.E.** (1989) Style self-incompatibility gene products of *Nicotiana glauca* are ribonucleases. *Nature* 342:955-957.
- McCormick S., Niedermeyer J., Fry J., Barnason A., Horsch R., Fraley R.** (1986) Leaf disc transformation of cultivated tomato (*L. esculentum*) using *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Cell Reports* 5:81-84.
- McCoy T.J.** (1987) Tissue culture evaluation of NaCl tolerance in *Medicago* species: Cellular versus whole plant response. *Plant Cell Reports* 6:31-34.
- McCue G.A.** (1952) The history of the use of the tomato: an annotated bibliography. *Annals of the Missouri Botanical Garden*:289-348.
- McMeekin D.** (1992) Representations on pre-columbian spindle whorls of the floral and fruit structure of economic plants. *Economic Botany* 46:171-180.
- Meinke D.W., Franzmann L.H., Nickle T.C., Yeung E.C.** (1994) Leafy cotyledon mutants of

- Arabidopsis*. The Plant Cell Online 6:1049-1064.
- 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* 22:265-274.
- Menda N., Semel Y., Peled D., Eshed Y., Zamir D.** (2004) *In silico* screening of a saturated mutation library of tomato. *The Plant Journal* 38:861-872.
- Mercado J., Sancho-Carrascosa M., Jiménez-Bermúdez S., Perán-Quesada R., Pliego-Alfaro F., Quesada M.** (2000) Assessment of *in vitro* growth of apical stem sections and adventitious organogenesis to evaluate salinity tolerance in cultivated tomato. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 62:101-106.
- Mickelbart M.V., Hasegawa P.M., Bailey-Serres J.** (2015) Genetic mechanisms of abiotic stress tolerance that translate to crop yield stability. *Nat Rev Genet* 16:237-251.
- Miki B., McHugh S.** (2004) Selectable marker genes in transgenic plants: applications, alternatives and biosafety. *Journal of Biotechnology* 107:193-232.
- Miller J.C., Tanksley S.D.** (1990) RFLP analysis of phylogenetic relationships and genetic variation in the genus *Lycopersicon*. *Theoretical and Applied Genetics* 80:437-448.
- Mills D., Tal M.** (2004) The effect of ventilation on *in vitro* response of seedlings of the cultivated tomato and its wild salt-tolerant relative *Lycopersicon pennellii* to salt stress. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 78:209-216.
- Minero-Amador A., Stewart K.** (1987) Osmotic potential and pH of fluid drilling gels as influenced by moisture loss and incorporation of growth regulators. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 112:26-28.
- Mishra P., Panigrahi K.C.** (2015) GIGANTEA—an emerging story. *Frontiers in Plant Science* 6.
- Mittler R., Blumwald E.** (2010) Genetic engineering for modern agriculture: challenges and perspectives. *Annual Review of Plant Biology* 61:443-462.
- Mittova V., Tal M., Volokita M., Guy M.** (2002a) 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* 115:393-400.
- Mittova V., Guy M., Tal M., Volokita M.** (2002b) Response of the cultivated tomato and its wild salt-tolerant relative *Lycopersicon pennellii* to salt-dependent oxidative stress: increased activities of antioxidant enzymes in root plastids. *Free Radical Research* 36:195-202.
- Mittova V., Guy M., Tal M., Volokita M.** (2004) Salinity up-regulates the antioxidative system in root mitochondria and peroxisomes of the wild salt-tolerant tomato species *Lycopersicon pennellii*. *Journal of Experimental Botany* 55:1105-1113.
- Mizoi J., Shinozaki K., Yamaguchi-Shinozaki K.** (2012) AP2/ERF family transcription factors in plant abiotic stress responses. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Regulatory Mechanisms* 1819:86-96.
- Molinero-Rosales N., Latorre A., Jamilena M., Lozano R.** (2004) SINGLE FLOWER TRUSS regulates the transition and maintenance of flowering in tomato. *Planta* 218:427-434.
- Molinero-Rosales N., Jamilena M., Zurita S., Gómez P., Capel J., Lozano R.** (1999) FALSIFLORA, the tomato orthologue of FLORICAULA and LEAFY, controls flowering time and floral meristem identity. *The Plant Journal* 20:685-693.
- Møller I.S., Tester M.** (2007) Salinity tolerance of *Arabidopsis*: a good model for cereals? *Trends in Plant Science* 12:534-540.
- Mollier P., Hoffmann B., Orsel M., Pelletier G.** (2000) Tagging of a cryptic promoter that

- confers root-specific GUS expression in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Reports* 19:1076-1083.
- Montoya T., Nomura T., Farrar K., Kaneta T., Yokota T., Bishop G.J.** (2002) Cloning the tomato *curl3* gene highlights the putative dual role of the leucine-rich repeat receptor kinase tBRI1/SR160 in plant steroid hormone and peptide hormone signaling. *The Plant Cell* 14:3163-3176.
- Mora-García S., Vert G., Yin Y., Caño-Delgado A., Cheong H., Chory J.** (2004) Nuclear protein phosphatases with Kelch-repeat domains modulate the response to brassinosteroids in *Arabidopsis*. *Genes & Development* 18:448-460.
- Moreno V.** (1997) La selección somaclonal, una alternativa biotecnológica para la mejora de plantas ornamentales, *Biotecnología y agricultura: las plantas del futuro*, Fundación Bancaixa, Valencia. pp. 59-69.
- Morgan J.M.** (1984) Osmoregulation and water stress in higher plants. *Annual Review of Plant Physiology* 35:299-319.
- Mori M., Tomita C., Sugimoto K., Hasegawa M., Hayashi N., Dubouzet J.G., Ochiai H., Sekimoto H., Hirochika H., Kikuchi S.** (2007) Isolation and molecular characterization of a Spotted leaf 18 mutant by modified activation-tagging in rice. *Plant Molecular Biology* 63:847-860.
- Morillon R., Catterou M., Sangwan R.S., Sangwan B.S., Lassalles J.-P.** (2001) Brassinolide may control aquaporin activities in *Arabidopsis thaliana*. *Planta* 212:199-204.
- Mouchel C.F., Briggs G.C., Hardtke C.S.** (2004) Natural genetic variation in *Arabidopsis* identifies BREVIS RADIX, a novel regulator of cell proliferation and elongation in the root. *Genes & Development* 18:700-714.
- Mouchel C.F., Osmont K.S., Hardtke C.S.** (2006) BRX mediates feedback between brassinosteroid levels and auxin signalling in root growth. *Nature* 443:458-461.
- Moyano E.** (2014) Sobreexpresión de genes en tomate y generación de líneas T-DNA en la especie silvestre *Solanum pennellii* para identificar determinantes de la tolerancia al estrés hídrico y la salinidad. CBAS-CSIC Murcia, Murcia.
- Moyle L.C., Graham E.B.** (2005) Genetics of hybrid incompatibility between *Lycopersicon esculentum* and *L. hirsutum*. *Genetics* 169:355-373.
- Moyle L.C., Nakazato T.** (2010) Hybrid incompatibility “snowballs” between *Solanum* species. *Science* 329:1521-1523.
- Müller D., Leyser O.** (2011) Auxin, cytokinin and the control of shoot branching. *Annals of Botany* 107:1203-1212.
- Munns R.** (2002) Comparative physiology of salt and water stress. *Plant, Cell & Environment* 25:239-250.
- Munns R.** (2005) Genes and salt tolerance: bringing them together. *New Phytologist* 167:645-663.
- Munns R., Tester M.** (2008) Mechanisms of salinity tolerance. *Annu. Rev. Plant Biol.* 59:651-681.
- Muños S., Ranc N., Botton E., Bérard A., Rolland S., Duffé P., Carretero Y., Le Paslier M.-C., Delalande C., Bouzayen M.** (2011) Increase in tomato locule number is controlled by two single-nucleotide polymorphisms located near WUSCHEL. *Plant Physiology* 156:2244-2254.
- Muñoz-Mayor A., Pineda B., Garcia-Abellán J.O., Garcia-Sogo B., Moyano E., Atares A., Vicente-Agulló F., Serrano R., Moreno V., Bolarin M.C.** (2008) The HAL1 function on Na⁺ homeostasis is maintained over time in salt-treated transgenic tomato plants, but the high reduction of Na⁺ in leaf is not associated with salt tolerance. *Physiologia*

- Plantarum 133:288-297.
- Murashige T., Skoog F.** (1962) A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15:473-497.
- Müssig C., Shin G.-H., Altmann T.** (2003) Brassinosteroids promote root growth in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 133:1261-1271.
- Mutschler M., Liedl B.** (1994) Interspecific crossing barriers in *Lycopersicon* and their relationship to self-incompatibility, in: E. Williams, *et al.* (Eds.), Genetic control of self-incompatibility and reproductive development in flowering plants, Springer Netherlands. pp. 164-188.
- Nagy R., Karandashov V., Chague V., Kalinkevich K., Tamasloukht M.B., Xu G., Jakobsen I., Levy A.A., Amrhein N., Bucher M.** (2005) The characterization of novel mycorrhiza-specific phosphate transporters from *Lycopersicon esculentum* and *Solanum tuberosum* uncovers functional redundancy in symbiotic phosphate transport in *Solanaceous* species. *The Plant Journal* 42:236-250.
- Nakabayashi R., Yonekura-Sakakibara K., Urano K., Suzuki M., Yamada Y., Nishizawa T., Matsuda F., Kojima M., Sakakibara H., Shinozaki K.** (2014) Enhancement of oxidative and drought tolerance in *Arabidopsis* by overaccumulation of antioxidant flavonoids. *The Plant Journal* 77:367-379.
- Nakayama N., Arroyo J.M., Simorowski J., May B., Martienssen R., Irish V.F.** (2005) Gene trap lines define domains of gene regulation in *Arabidopsis* petals and stamens. *The Plant Cell* 17:2486-2506.
- Nakazato T., Warren D.L., Moyle L.C.** (2010) Ecological and geographic modes of species divergence in wild tomatoes. *American Journal of Botany* 97:680-693.
- Nam K.H., Li J.** (2002) BRI1/BAK1, a receptor kinase pair mediating brassinosteroid signaling. *Cell* 110:203-212.
- Nass R., Cunningham K.W., Rao R.** (1997) Intracellular sequestration of sodium by a novel Na⁺/H⁺ exchanger in yeast is enhanced by mutations in the plasma membrane H⁺-ATPase. *Journal of Biological Chemistry* 272:26145-26152.
- Nayyar H., Walia D.** (2003) Water stress induced proline accumulation in contrasting wheat genotypes as affected by calcium and abscisic acid. *Biologia Plantarum* 46:275-279.
- Negruk V., Eisner G., Lemieux B.** (1996) Addition-deletion mutations in transgenic *Arabidopsis thaliana* generated by the seed co-cultivation method. *Genome* 39:1117-1122.
- Neill S.O., Gould K.S.** (2003) Anthocyanins in leaves: light attenuators or antioxidants? *Functional Plant Biology* 30:865-873.
- Nesbitt T.C., Tanksley S.D.** (2002) Comparative sequencing in the genus *Lycopersicon*: Implications for the evolution of fruit size in the domestication of cultivated tomatoes. *Genetics* 162:365-379.
- Neumann P.M., Van Volkenburgh E., Cleland R.E.** (1988) Salinity stress inhibits bean leaf expansion by reducing turgor, not wall extensibility. *Plant Physiology* 88:233-237.
- Niu G., Cabrera R.I.** (2010) Growth and physiological responses of landscape plants to saline water irrigation: A review. *HortScience* 45:1605-1609.
- Nordström A., Tarkowski P., Tarkowska D., Norbaek R., Åstot C., Dolezal K., Sandberg G.** (2004) Auxin regulation of cytokinin biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*: a factor of potential importance for auxin–cytokinin-regulated development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101:8039-8044.
- Nublát A., Desplans J., Casse F., Berthomieu P.** (2001) *sas1*, an *Arabidopsis* mutant overaccumulating sodium in the shoot, shows deficiency in the control of the root

- radial transport of sodium. *The Plant Cell* 13:125-137.
- Nuccio M.L., Rhodest D., McNeil S.D., Hanson A.D.** (1999) Metabolic engineering of plants for osmotic stress resistance. *Current Opinion in Plant Biology* 2:128-134.
- Ober E.S., Sharp R.E.** (1994) Proline accumulation in maize (*Zea mays* L.) primary roots at low water potentials (I. Requirement for increased levels of abscisic acid). *Plant Physiology* 105:981-987.
- Odell J.T., Nagy F., Chua N.-H.** (1985) Identification of DNA sequences required for activity of the cauliflower mosaic virus 35S promoter. *Nature* 313:810-812.
- O'Kane C.J., Gehring W.J.** (1987) Detection *in situ* of genomic regulatory elements in *Drosophila*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 84:9123-9127.
- Oldeman L., Hakkeling R.u., Sombroek W.G.** (1990) World map of the status of human-induced soil degradation: an explanatory note. International Soil Reference and Information Centre.
- Olías R., Eljakaoui Z., Li J., De Morales P.A., Marín-Manzano M.C., Pardo J.M., Belver A.** (2009a) The plasma membrane Na⁺/H⁺ antiporter SOS1 is essential for salt tolerance in tomato and affects the partitioning of Na⁺ between plant organs. *Plant, Cell & Environment* 32:904-916.
- Olías R., Eljakaoui Z., Pardo J.M., Belver A.** (2009b) The Na⁺/H⁺ exchanger SOS1 controls extrusion and distribution of Na⁺ in tomato plants under salinity conditions. *Plant Signal Behaviour* 4: 973–976.
- Oosumi T., Gruszewski H.A., Blischak L.A., Baxter A.J., Wadl P.A., Shuman J.L., Veilleux R.E., Shulaev V.** (2006) High-efficiency transformation of the diploid strawberry (*Fragaria vesca*) for functional genomics. *Planta* 223:1219-1230.
- Orellana S., Yanez M., Espinoza A., Verdugo I., Gonzalez E., Ruiz-Lara S., Casaretto J.A.** (2010) The transcription factor SIAREB1 confers drought, salt stress tolerance and regulates biotic and abiotic stress-related genes in tomato. *Plant, Cell & Environment* 33:2191-2208.
- Orsi C.H., Tanksley S.D.** (2009) Natural variation in an ABC transporter gene associated with seed size evolution in tomato species. *PLoS genetics* 5:e1000347.
- Osborne B.I., Corr C.A., Prince J.P., Hehl R., Tanksley S.D., McCormick S., Baker B.** (1991) Ac transposition from a T-DNA can generate linked and unlinked clusters of insertions in the tomato genome. *Genetics* 129:833-844.
- Osmond C.** (1976) Ion absorption and carbon metabolism in cells of higher plants, in: O.L. Lange, *et al.*, *Transport in Plants II*, Springer. pp. 347-372.
- Osorio J., Osorio M., Chaves M., Pereira J.** (1998) Water deficits are more important in delaying growth than in changing patterns of carbon allocation in *Eucalyptus globulus*. *Tree Physiology* 18:363-373.
- Osorio S., Alba R., Damasceno C.M., Lopez-Casado G., Lohse M., Zanor M.I., Tohge T., Usadel B., Rose J.K., Fei Z.** (2011) Systems biology of tomato fruit development: combined transcript, protein, and metabolite analysis of tomato transcription factor (*nor*, *rin*) and ethylene receptor (*Nr*) mutants reveals novel regulatory interactions. *Plant Physiology* 157:405-425.
- Özdemir F., Bor M., Demiral T., Türkan İ.** (2004) Effects of 24-epibrassinolide on seed germination, seedling growth, lipid peroxidation, proline content and antioxidative system of rice (*Oryza sativa* L.) under salinity stress. *Plant Growth Regulation* 42:203-211.
- Pan Q., Liu Y.-S., Budai-Hadrian O., Sela M., Carmel-Goren L., Zamir D., Fluhr R.** (2000) Comparative genetics of nucleotide binding site-leucine rich repeat resistance gene

- homologues in the genomes of two dicotyledons: Tomato and *Arabidopsis*. *Genetics* 155:309-322.
- Pardo J.M., Cubero B., Leidi E.O., Quintero F.J.** (2006) Alkali cation exchangers: roles in cellular homeostasis and stress tolerance. *Journal of Experimental Botany* 57:1181-1199.
- Parida A.K., Das A.B.** (2005) Salt tolerance and salinity effects on plants: a review. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 60:324-349.
- Park H.J., Kim W.-Y., Yun D.-J.** (2013) A role for GIGANTEA: keeping the balance between flowering and salinity stress tolerance. *Plant Signaling & Behavior* 8:e24820.
- Peleg Z., Blumwald E.** (2011) Hormone balance and abiotic stress tolerance in crop plants. *Current Opinion in Plant Biology* 14:290-295.
- Peng H., Huang H., Yang Y., Zhai Y., Wu J., Huang D., Lu T.** (2005) Functional analysis of GUS expression patterns and T-DNA integration characteristics in rice enhancer trap lines. *Plant Science* 168:1571-1579.
- Peralta I.E., Spooner D.M.** (2006) History, origin and early cultivation of tomato (*Solanaceae*), in: M. Razdan and A. Mattoo (Eds.), *Genetic improvement of solanaceous crops*, CRC Press. pp. 1-27.
- Peralta I.E., Spooner D.M., Knapp S.** (2008) Taxonomy of wild tomatoes and their relatives (*Solanum* sect. *Lycopersoides*, sect. *Juglandifolia*, sect. *Lycopersicon*; *Solanaceae*). *Amer. Society of Plant Taxonomists* 84.
- Perez-Alfocea F., Estan M., Caro M., Bolarin M.** (1993) Response of tomato cultivars to salinity. *Plant and Soil* 150:203-211.
- Perez-Alfocea F., Guerrier G., Estan M., Bolarin M.C.** (1994) Comparative salt responses at cell and whole-plant levels of cultivated and wild tomato species and their hybrid. *Journal of Horticultural Science* 69:639-644.
- Pérez-Martín F., Campos J.F., Pineda B., Gimenez E., Moreno V., Capel J., Bolarín M.C., Lozano R., Angosto T.** (2013) Development of stamen organs requires the SUCCULENT STAMENS (SUS) tomato gene., XIII Congresso Luso-Espanhol de Fisiologia Vegetal.
- Pérez-Pérez J.M., Ponce M.a.R., Micol J.L.** (2002) The UCU1 *Arabidopsis* gene encodes a SHAGGY/GSK3-like kinase required for cell expansion along the proximodistal axis. *Developmental Biology* 242:161-173.
- Périlleux C., Lobet G., Tocquin P.** (2014) Inflorescence development in tomato: gene functions within a zigzag model. *Frontiers in Plant Science* 5:121.
- Pesaresi P., Mizzotti C., Colombo M., Masiero S.** (2014) Genetic regulation and structural changes during tomato fruit development and ripening. *Frontiers in Plant Science* 5:124
- Peterhans A., Schlüpmann H., Basse C., Paszkowski J.** (1990) Intrachromosomal recombination in plants. *The EMBO journal* 9:3437-3445.
- Petrášek J., Friml J.** (2009) Auxin transport routes in plant development. *Development* 136:2675-2688.
- Phills B., Peck N., MacDonald G., Robinson R.** (1979) Differential response of *Lycopersicon* and *Solanum* species to salinity. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 104:349-352.
- Pimentel D., Berger B., Filiberto D., Newton M., Wolfe B., Karabinakis E., Clark S., Poon E., Abbett E., Nandagopal S.** (2004) *Water Resources: Agricultural and Environmental Issues*. *BioScience* 54:909-918.
- Pineda B.** (2005) Análisis funcional de diversos genes relacionados con la tolerancia a la

- salinidad y el estrés hídrico en plantas transgénicas de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill). Universidad Politécnica de Valencia, Valencia.
- Pineda B., Giménez-Caminero E., García-Sogo B., Antón M.T., Atarés A., Capel J., Lozano R., Angosto T., Moreno V.** (2010) Genetic and physiological characterization of the *arlequin* insertional mutant reveals a key regulator of reproductive development in tomato. *Plant and Cell Physiology* 51:435-447.
- Pineda B., Antón T., García-Sogo B., Atarés A., Scheicher P., Campo s.J.F., Morales B., García M., Pérez F., Angosto T., Lozano R., Bolarín M.C., Moreno V.** (2011) *Solanum lycopersicum salt sensitive-8*, un mutante insercional de tomate con una elevada hipersensibilidad a estrés salino. IX Reunión de la Sociedad Española de Cultivo *in vitro* de Tejidos Vegetales.
- Pineda B., García-Abellán J.O., Antón T., Pérez F., Moyano E., García Sogo B., Campos J.F., Angosto T., Morales B., Capel J., Moreno V., Lozano R., Bolarín M.C., Atarés A.** (2012) Tomato: Genomic approaches for salt and drought stress tolerance, in: N. Tuteja, *et al.* (Eds.), *Improving Crop Resistance to Abiotic Stress*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim. pp. 1085-1120.
- Plant Á.L., Cohen A., Moses M.S., Bray E.A.** (1991) Nucleotide sequence and spatial expression pattern of a drought- and abscisic acid-induced gene of tomato. *Plant Physiology* 97:900-906.
- Plesch G., Kamann E., Mueller-Roeber B.** (2000) Cloning of regulatory sequences mediating guard-cell-specific gene expression. *Gene* 249:83-89.
- Pnueli L., Carmel-Goren L., Hareven D., Gutfinger T., Alvarez J., Ganal M., Zamir D., Lifschitz E.** (1998) The SELF-PRUNING gene of tomato regulates vegetative to reproductive switching of sympodial meristems and is the ortholog of CEN and TFL1. *Development* 125:1979-1989.
- Prasad T., Li X., Abdel-Rahman A., Hosokawa Z., Cloud N., LaMotte C., Cline M.** (1993) Does auxin play a role in the release of apical dominance by shoot inversion in *Ipomoea nil*? *Annals of Botany* 71:223-229.
- Pustovoitova T., Zhdanova N., Zholkevich V.** (2001) Epibrassinolide increases plant drought resistance. *Doklady Biochemistry and Biophysics* 376:36-38.
- Qin G., Kang D., Dong Y., Shen Y., Zhang L., Deng X., Zhang Y., Li S., Chen N., Niu W.** (2003) Obtaining and analysis of flanking sequences from T-DNA transformants of *Arabidopsis*. *Plant Science* 165:941-949.
- Qiu Q.-S., Guo Y., Dietrich M.A., Schumaker K.S., Zhu J.-K.** (2002) Regulation of SOS1, a plasma membrane Na⁺/H⁺ exchanger in *Arabidopsis thaliana*, by SOS2 and SOS3. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99:8436-8441.
- Quinet M., Dielen V., Batoko H., Boutry M., Havelange A., Kinet J.M.** (2006) Genetic interactions in the control of flowering time and reproductive structure development in tomato (*Solanum lycopersicum*). *New Phytologist* 170:701-710.
- Quintero F.J., Ohta M., Shi H., Zhu J.-K., Pardo J.M.** (2002) Reconstitution in yeast of the *Arabidopsis* SOS signaling pathway for Na⁺ homeostasis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99:9061-9066.
- Radhamony R.N., Mohan Prasad A., Srinivasan R.** (2005) T-DNA insertional mutagenesis in *Arabidopsis*: a tool for functional genomics. *Electronic Journal of Biotechnology* 8:82-106.
- Rai M.K., Kalia R.K., Singh R., Gangola M.P., Dhawan A.K.** (2011) Developing stress tolerant plants through *in vitro* selection—An overview of the recent progress. *Environmental and Experimental Botany* 71:89-98.

- Rameau C., Bertheloot J., Leduc N., Andrieu B., Sakr S., Foucher F.** (2015) Multiple pathways regulate shoot branching. *Frontiers in Plant Science* 5:741.
- Raven J.A.** (1985) Regulation of pH and generation of osmolarity in vascular plants: A cost-benefit analysis in relation to efficiency of use of energy, nitrogen and water. *New Phytologist* 101:25-77.
- Richman A.D., Uyenoyama M.K.K., Kohn J.R.R.** (1996) Allelic Diversity and Gene Genealogy at the Self-Incompatibility Locus in the Solanaceae. *Science* 273:1212-1216.
- Rick C.M.** (1969) Controlled introgression of chromosomes of *Solanum pennellii* into *Lycopersicon esculentum*: segregation and recombination. *Genetics* 62:753.
- Rick C.M.** (1973) Potential genetic resources in tomato species: clues from observations in native habitats, in: M.S. Adrian (Ed.), *Genes, enzymes, and populations*, Springer. pp. 255-269.
- Rick C.M.** (1976) Tomato, in: N. Simmonds (Ed.), *Evolution of Crop Plants*, Longman Group, London. pp. 268 - 273.
- Rick C.M.** (1982) The potential of exotic germplasm for tomato improvement, in: W. Scowcrof and K. Frey (Eds.), *Plant Improvement and Somatic Cell Genetics*, Academic Press, New York.
- Rick C.M., Sawant A.C.** (1955) Factor interactions affecting the phenotypic expression of the jointless character in tomatoes. *Am. Soc. Hort. Sci.* 66:354-360.
- Rick C.M., Tanksley S.D.** (1981) Genetic variation in *Solanum pennellii*: Comparisons with two other sympatric tomato species. *Plant Systematics and Evolution* 139:11-45.
- Rick C.M., Holle M.** (1990) Andean *Lycopersicon esculentum* var. *cerasiforme*: genetic variation and its evolutionary significance. *Economic Botany* 44:69-78.
- Riechmann J.L., Ratcliffe O.J.** (2000) A genomic perspective on plant transcription factors. *Current Opinion in Plant Biology* 3:423-434.
- Rivero R.M., Kojima M., Gepstein A., Sakakibara H., Mittler R., Gepstein S., Blumwald E.** (2007) Delayed leaf senescence induces extreme drought tolerance in a flowering plant. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104:19631-19636.
- Robertson L.D., Labate J.A.** (2006) Genetic resources of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) and wild relatives, in: M.K. Razdan, *et al.*, (Eds.), *Genetic Improvement of Solanaceous Crops. Tomato*, CRC Press. pp. 25-75.
- Rodriguez H.G., Roberts J.K., Jordan W.R., Drew M.C.** (1997) Growth, water relations, and accumulation of organic and inorganic solutes in roots of maize seedlings during salt stress. *Plant Physiology* 113:881-893.
- Rodríguez-Navarro A., Rubio F.** (2006) High-affinity potassium and sodium transport systems in plants. *Journal of Experimental Botany* 57:1149-1160.
- Rodríguez-Navarro A.** (2000) Potassium transport in fungi and plants. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Biomembranes* 1469:1-30.
- Rojas-Martínez L., Visser R.G., de Klerk G.-J.** (2010) The hyperhydricity syndrome: waterlogging of plant tissues as a major cause. *Propagation of Ornamental Plants* 10:169-175.
- Romero-Aranda R., Soria T., Cuartero J.** (2001) Tomato plant-water uptake and plant-water relationships under saline growth conditions. *Plant Science* 160:265-272.
- Romero-Aranda M.R., Jurado O., Cuartero J.** (2006) Silicon alleviates the deleterious salt effect on tomato plant growth by improving plant water status. *Journal of Plant Physiology* 163:847-855.
- Rommens C.M., Rudenko G.N., Dijkwel P.P., van Haaren M.J., Ouwkerk P.B., Blok K.M., Nijkamp H.J.J., Hille J.** (1992) Characterization of the Ac/Ds behaviour in transgenic

- tomato plants using plasmid rescue. *Plant Molecular Biology* 20:61-70.
- Rousseaux M.C., Jones C.M., Adams D., Chetelat R., Bennett A., Powell A.** (2005) QTL analysis of fruit antioxidants in tomato using *Lycopersicon pennellii* introgression lines. *Theoretical and Applied Genetics* 111:1396-1408.
- Roy S.J., Negrão S., Tester M.** (2014) Salt resistant crop plants. *Current Opinion in Biotechnology* 26:115-124.
- Rudas V., Zavgorodnya A., Cherep N., Gleba Y.** (1993) Genetic transformation of some *Solanum* and *Lycopersicon* wild species by leaf-discs method. *Biopolymers and Cell* 9:73-77.
- Ruegger M., Dewey E., Gray W.M., Hobbie L., Turner J., Estelle M.** (1998) The TIR1 protein of *Arabidopsis* functions in auxin response and is related to human SKP2 and yeast Grr1p. *Genes & Development* 12:198-207.
- Ruffoni B., Savona M.** (2013) Physiological and biochemical analysis of growth abnormalities associated with plant tissue culture. *Horticulture, Environment, and Biotechnology* 54:191-205.
- Rus A., Panoff M., Perez-Alfocea F., Bolarin M.** (1999) NaCl responses in tomato calli and whole plants. *Journal of Plant Physiology* 155:727-733.
- Rus A.M., Rios S., Olmos E., Santa-Cruz A., Bolarin M.C.** (2000) Long-term culture modifies the salt responses of callus lines of salt-tolerant and salt-sensitive tomato species. *Journal of Plant Physiology* 157:413-420.
- Rus A., Yokoi S., Sharkhuu A., Reddy M., Lee B.-h., Matsumoto T.K., Koiwa H., Zhu J.-K., Bressan R.A., Hasegawa P.M.** (2001) AtHKT1 is a salt tolerance determinant that controls Na⁺ entry into plant roots. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 98:14150-14155.
- Ryu J.Y., Park C.-M., Seo P.J.** (2011) The floral repressor BROTHER OF FT AND TFL1 (BFT) modulates flowering initiation under high salinity in *Arabidopsis*. *Molecules and Cells* 32:295-303.
- Ryu J.Y., Lee H.-J., Seo P.J., Jung J.-H., Ahn J.H., Park C.-M.** (2014) The *Arabidopsis* floral repressor BFT delays flowering by competing with FT for FD binding under high salinity. *Molecular Plant* 7:377-387.
- Ryu C.-H., You J.-H., Kang H.-G., Hur J., Kim Y.-H., Han M.-J., An K., Chung B.-C., Lee C.-H., An G.** (2004) Generation of T-DNA tagging lines with a bidirectional gene trap vector and the establishment of an insertion-site database. *Plant Molecular Biology* 54:489-502.
- Ryu C.-H., Lee S., Cho L.-H., Kim S.L., Lee Y.-S., Choi S.C., Jeong H.J., Yi J., Park S.J., Han C.-D.** (2009) OsMADS50 and OsMADS56 function antagonistically in regulating long day (LD)-dependent flowering in rice. *Plant, Cell & Environment* 32:1412-1427.
- Sachs T.** (1981) The control of the patterned differentiation of vascular tissues. *Advances in Botanical Research* 9:151-262.
- Sachs T., Thimann K.V.** (1967) The role of auxins and cytokinins in the release of buds from dominance. *American Journal of Botany*:136-144.
- Saisho D., Tanno K.-i., Chono M., Honda I., Kitano H., Takeda K.** (2004) Spontaneous brassinolide-insensitive barley mutants 'uzu' adapted to east Asia. *Breeding Science* 54:409-416.
- Sakhanokho H.F., Kelley R.Y.** (2009) Influence of salicylic acid on *in vitro* propagation and salt tolerance in *Hibiscus acetosella* and *Hibiscus moscheutos* (cv 'Luna Red'). *African Journal of Biotechnology* 8:1474-1481.

- Salim M.** (1989) Effects of salinity and relative humidity on growth and ionic relations of plants. *New Phytologist* 113:13-20.
- Sallaud C., Meynard D., Van Boxtel J., Gay C., Bes M., Brizard J., Larmande P., Ortega D., Raynal M., Portefaix M.** (2003) Highly efficient production and characterization of T-DNA plants for rice (*Oryza sativa* L.) functional genomics. *Theoretical and Applied Genetics* 106:1396-1408.
- Sallaud C., Gay C., Larmande P., Bes M., Piffanelli P., Piegu B., Droc G., Regad F., Bourgeois E., Meynard D.** (2004) High throughput T-DNA insertion mutagenesis in rice: a first step towards *in silico* reverse genetics. *The Plant Journal* 39:450-464.
- Samach A., Lotan H.** (2007) The transition to flowering in tomato. *Plant Biotechnology* 24:71-82.
- Sánchez 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, Valencia.
- Sanchez-Bel P., Egea I., Flores F.B., Bolarin M.C.** (2012) Tomato: Grafting to improve salt tolerance, in: N. Tuteja, *et al.*, (Eds.), *Improving Crop Resistance to Abiotic Stress*, Volume 1 & Volume 2:1067-1084.
- Santa-Cruz A., Acosta M., Rus A., Bolarin M.C.** (1999) Short-term salt tolerance mechanisms in differentially salt tolerant tomato species. *Plant Physiology and Biochemistry* 37:65-71.
- Saranga Y., Zamir D., Marani A., Rudich J.** (1991) Breeding tomatoes for salt tolerance: field evaluation of *Lycopersicon* germplasm for yield and dry-matter production. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 116:1067-1071.
- Sasse J.M.** (2003) Physiological actions of brassinosteroids: an update. *Journal of Plant Growth Regulation* 22:276-288.
- Satoh R., Nakashima K., Seki M., Shinozaki K., Yamaguchi-Shinozaki K.** (2002) ACTCAT, a novel cis-acting element for proline- and hypoosmolarity-responsive expression of the ProDH gene encoding proline dehydrogenase in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 130:709-719.
- Sawhney V.K., Greyson R.I.** (1972) On the initiation of the inflorescence and floral organs in tomato (*Lycopersicon esculentum*). *Canadian Journal of Botany* 50:1493-1495.
- Schachtman D.P., Goodger J.Q.** (2008) Chemical root to shoot signaling under drought. *Trends in Plant Science* 13:281-287.
- Schauer N., Semel Y., Roessner U., Gur A., Balbo I., Carrari F., Pleban T., Perez-Melis A., Bruedigam C., Kopka J.** (2006) Comprehensive metabolic profiling and phenotyping of interspecific introgression lines for tomato improvement. *Nature Biotechnology* 24:447-454.
- Scheres B., McKhann H.I., Van Den Berg C.** (1996) Roots Redefined: Anatomical and Genetic Analysis of Root Development. *Plant Physiology* 111:959-964.
- Scheres B., Benfey P., Dolan L.** (2002) Root development. *The Arabidopsis Book*:e0101.
- Schilling G., Schiller C., Otto S.** (1991) Influence of brassinosteroids on organ relations and enzyme activities of sugar-beet plants. *ACS Symposium Series-American Chemical Society (USA)*.
- Scholte M., d'Erfurth I., Rippa S., Mondy S., Cosson V., Durand P., Breda C., Trinh H., Rodriguez-Llorente I., Kondorosi E.** (2002) T-DNA tagging in the model legume *Medicago truncatula* allows efficient gene discovery. *Molecular Breeding* 10:203-215.
- Schroeder J.I., Allen G.J., Hugouvieux V., Kwak J.M., Waner D.** (2001) Guard cell signal transduction. *Annual Review of Plant Biology* 52:627-658.

- Schupp J.M., Price L.B., Klevytska A., Keim P.** (1999) Internal and flanking sequence from AFLP fragments using ligation-mediated suppression PCR. *BioTechniques* 26:905-910.
- Sekhar K.N.C., Sawhney V.K.** (1984) A scanning electron microscope study of the development and surface features of floral organs of tomato (*Lycopersicon esculentum*). *Canadian Journal of Botany* 62:2403-2413.
- Seong E.-S., Kwon S.-u., Ghimire B.K., Yu C.-Y., Cho D.-H., Lim J.-D., Kim K.-S., Heo K., Lim E.-S., Chung I.-M.** (2008) LebZIP2 induced by salt and drought stress and transient overexpression by *Agrobacterium*. *BMB reports* 41:693-698.
- Serrano R.** (1996) Salt tolerance in plants and microorganisms: toxicity targets and defense responses. *International Review of Cytology* 165:1-52.
- Sessions A., Burke E., Presting G., Aux G., McElver J., Patton D., Dietrich B., Ho P., Bacwaden J., Ko C.** (2002) A high-throughput *Arabidopsis* reverse genetics system. *The Plant Cell Online* 14:2985-2994.
- Shahbaz M., Ashraf M.** (2008) Does exogenous application of 24-epibrassinolide ameliorate salt induced growth inhibition in wheat (*Triticum aestivum* L.)? *Plant Growth Regulation* 55:51-64.
- Shahin E.A.** (1985) Totipotency of tomato protoplasts. *Theoretical and Applied Genetics* 69:235-240.
- Shalata A., Tal M.** (1998) The effect of salt stress on lipid peroxidation and antioxidants in the leaf of the cultivated tomato and its wild salt-tolerant relative *Lycopersicon pennellii*. *Physiologia Plantarum* 104:169-174.
- 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* 112:487-494.
- Shannon M., Gronwald J., Tal M.** (1987) Effects of salinity on growth and accumulation of organic and inorganic ions in cultivated and wild tomato species. *Journal of the American Society for Horticultural Science (USA)*.
- Sharma P., Jha A.B., Dubey R.S., Pessarakli M.** (2012) Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidative defense mechanism in plants under stressful conditions. *Journal of Botany* 2012:1-26.
- Sharp R.E., Silk W.K., Hsiao T.C.** (1988) Growth of the maize primary root at low water potentials I. Spatial distribution of expansive growth. *Plant Physiology* 87:50-57.
- Shi H., Ishitani M., Kim C., Zhu J.-K.** (2000) The *Arabidopsis thaliana* salt tolerance gene SOS1 encodes a putative Na⁺/H⁺ antiporter. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 97:6896-6901.
- Shi H., Quintero F.J., Pardo J.M., Zhu J.-K.** (2002) The putative plasma membrane Na⁺/H⁺ antiporter SOS1 controls long-distance Na⁺ transport in plants. *The Plant Cell* 14:465-477.
- Shi H., Lee B.-h., Wu S.-J., Zhu J.-K.** (2003) Overexpression of a plasma membrane Na⁺/H⁺ antiporter gene improves salt tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *Nature Biotech* 21:81-85.
- Shi H., Xiong L., Stevenson B., Lu T., Zhu J.-K.** (2002) The *Arabidopsis* salt overly sensitive 4 mutants uncover a critical role for vitamin B6 in plant salt tolerance. *The Plant Cell* 14:575-588.
- Shi H., Kim Y., Guo Y., Stevenson B., Zhu J.-K.** (2003) The *Arabidopsis* SOS5 locus encodes a putative cell surface adhesion protein and is required for normal cell expansion. *The Plant Cell* 15:19-32.
- Shibata D.** (2005) Genome sequencing and functional genomics approaches in tomato.

- Journal of General Plant Pathology 71:1-7.
- Shibli R.A., Kushad M., Yousef G.G., Lila M.A.** (2007) Physiological and biochemical responses of tomato microshoots to induced salinity stress with associated ethylene accumulation. *Plant Growth Regulation* 51:159-169.
- Shinozaki K., Yamaguchi-Shinozaki K.** (2007) Gene networks involved in drought stress response and tolerance. *Journal of Experimental Botany* 58:221-227.
- Shu Q.Y.** (2012) *Plant Mutation Breeding and Biotechnology* CAB International, Wallingford, UK.
- Sikora P., Chawade A., Larsson M., Olsson J., Olsson O.** (2012) Mutagenesis as a tool in plant genetics, functional genomics, and breeding. *International Journal of Plant Genomics* 2011.
- Singh A.P., Savaldi-Goldstein S.** (2015) Growth control: brassinosteroid activity gets context. *Journal of Experimental Botany* 66:1123-1132.
- Sirhindi G.** (2013) Brassinosteroids: biosynthesis and role in growth, development, and thermotolerance responses, in: G. R. Rout and A. B. Das (Eds.), *Molecular Stress Physiology of Plants*, Springer. pp. 309-329.
- Smith E.F., Townsend C.O.** (1907) A plant-tumor of bacterial origin. *Science*:671-673.
- Smith D.L., Fedoroff N.V.** (1995) LRP1, a gene expressed in lateral and adventitious root primordia of *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 7:735-745.
- Smulders M., Rus-Kortekaas W., Gilissen L.** (1994) Development of polysomaty during differentiation in diploid and tetraploid tomato (*Lycopersicon esculentum*) plants. *Plant Science* 97:53-60.
- Song J.Q., Fujiyama H.** (1996) Difference in response of rice and tomato subjected to sodium salinization to the addition of calcium. *Soil Science and Plant Nutrition* 42:503-510.
- Song C.-P., Agarwal M., Ohta M., Guo Y., Halfter U., Wang P., Zhu J.-K.** (2005) Role of an *Arabidopsis* AP2/EREBP-type transcriptional repressor in abscisic acid and drought stress responses. *The Plant Cell Online* 17:2384-2396.
- Sorefan K., Booker J., Haurogné K., Goussot M., Bainbridge K., Foo E., Chatfield S., Ward S., Beveridge C., Rameau C.** (2003) MAX4 and RMS1 are orthologous dioxygenase-like genes that regulate shoot branching in *Arabidopsis* and pea. *Genes & Development* 17:1469-1474.
- Sperdouli I., Moustakas M.** (2012) Interaction of proline, sugars, and anthocyanins during photosynthetic acclimation of *Arabidopsis thaliana* to drought stress. *Journal of Plant Physiology* 169:577-585.
- Springer P.S.** (2000) Gene traps: tools for plant development and genomics. *The Plant Cell Online* 12:1007-1020.
- Springer P.S., McCombie W.R., Sundaresan V., Martienssen R.A.** (1995) Gene trap tagging of PROLIFERA, an essential MCM2-3-5-like gene in *Arabidopsis*. *Science* 268:877-880.
- Steeves T.A., Sussex I.M.** (1989) *Patterns in plant development*. Cambridge University Press, Cambridge, UK.
- Streeter J., Lohnes D., Fioritto R.** (2001) Patterns of pinitol accumulation in soybean plants and relationships to drought tolerance. *Plant, Cell & Environment* 24:429-438.
- Streitner C., Danisman S., Wehrle F., Schöning J.C., Alfano J.R., Staiger D.** (2008) The small glycine-rich RNA binding protein AtGRP7 promotes floral transition in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* 56:239-250.
- Sugimoto K., Jiao Y., Meyerowitz E.M.** (2010) *Arabidopsis* regeneration from multiple tissues occurs via a root development pathway. *Developmental Cell* 18:463-471.
- Sun Y., Allen R.D.** (2005) Functional analysis of the BIN2 genes of cotton. *Molecular Genetics*

- and Genomics 274:51-59.
- Sun Y., Fan X.-Y., Cao D.-M., Tang W., He K., Zhu J.-Y., He J.-X., Bai M.-Y., Zhu S., Oh E.** (2010) Integration of brassinosteroid signal transduction with the transcription network for plant growth regulation in *Arabidopsis*. *Developmental Cell* 19:765-777.
- Sundaresan V., Springer P., Volpe T., Haward S., Jones J.D., Dean C., Ma H., Martienssen R.** (1995) Patterns of gene action in plant development revealed by enhancer trap and gene trap transposable elements. *Genes & Development* 9:1797-1810.
- Svitashev S.K., Somers D.A.** (2002) Characterization of transgene loci in plants using FISH: A picture is worth a thousand words. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 69:205-214.
- Swaminathan K., Yang Y., Grotz N., Campisi L., Jack T.** (2000) An enhancer trap line associated with a D-class cyclin gene in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 124:1658-1667.
- Tahal R., Mills D., Heimer Y., Tal M.** (2000) The relation between low K⁺/Na⁺ ratio and salt-tolerance in the wild tomato species *Lycopersicon pennellii*. *Journal of Plant Physiology* 157:59-64.
- Takeda T., Suwa Y., Suzuki M., Kitano H., Ueguchi-Tanaka M., Ashikari M., Matsuoka M., Ueguchi C.** (2003) The OsTB1 gene negatively regulates lateral branching in rice. *The Plant Journal* 33:513-520.
- Takeo K.** (2012) Stress-induced flowering, in: P. Ahmad, *et al.* (Eds.), *Abiotic Stress Responses in Plants*, Springer. pp. 331-345.
- Takken F.L., Schipper D., Nijkamp H.J.J., Hille J.** (1998) Identification and Ds-tagged isolation of a new gene at the Cf-4 locus of tomato involved in disease resistance to *Cladosporium fulvum* race 5. *The Plant Journal* 14:401-411.
- Tal M.** (1990) Somaclonal variation for salt resistance, in: Bajaj (Ed.), *Somaclonal Variation in Crop Improvement I*, Springer. pp. 236-257.
- Tal M., Shannon M.** (1983) Salt tolerance in the wild relatives of the cultivated tomato: Responses of *Lycopersicon esculentum*, *L. cheesmanii*, *L. peruvianum*, *Solanum pennellii* and F1 hybrids to high salinity. *Functional Plant Biology* 10:109-117.
- Tal M., Heikin H., Dehan K.** (1978) Salt tolerance in the wild relatives of the cultivated tomato: responses of callus tissue of *Lycopersicon esculentum*, *L. peruvianum* and *Solanum pennellii* to high salinity. *Zeitschrift für Pflanzenphysiologie* 86:231-240.
- Tal M., Katz A., Heikin H., Dehan K.** (1979) Salt tolerance in the wild relatives of the cultivated tomato: proline accumulation in *Lycopersicon esculentum* Mill., *L. peruvianum* Mill. and *Solanum pennellii* Cor. treated with NaCl and polyethylene glycole. *New Phytologist* 82:349-355.
- Taleisnik E.L.** (1987) Salinity effects on growth and carbon balance in *Lycopersicon esculentum* and *L. pennellii*. *Physiologia Plantarum* 71:213-218.
- Tanaka M., Takei K., Kojima M., Sakakibara H., Mori H.** (2006) Auxin controls local cytokinin biosynthesis in the nodal stem in apical dominance. *The Plant Journal* 45:1028-1036.
- Tang W., Kim T.-W., Osés-Prieto J.A., Sun Y., Deng Z., Zhu S., Wang R., Burlingame A.L., Wang Z.-Y.** (2008) BSKs mediate signal transduction from the receptor kinase BRI1 in *Arabidopsis*. *Science* 321:557-560.
- Tanksley S.D., Kush G.S.** (2003) Charles Madera Rick, in: N. A. o. Sciences (Ed.), *Biographical memoirs*, National Academies Press, Washington, D.C.
- Tax F.E., Vernon D.M.** (2001) T-DNA-associated duplication/translocations in *Arabidopsis*. Implications for mutant analysis and functional genomics. *Plant Physiology* 126:1527-1538.
- Teeri T., Herrera-Estrella L., Depicker A., Van Montagu M., Palva E.** (1986) Identification of plant promoters *in situ* by T-DNA-mediated transcriptional fusions to the npt-II

- gene. The EMBO journal 5:1755.
- Tester M., Davenport R.** (2003) Na⁺ tolerance and Na⁺ transport in higher plants. *Annals of Botany* 91:503-527.
- Tester M., Bacic A.** (2005) Abiotic stress tolerance in grasses. From model plants to crop plants. *Plant Physiology* 137:791-793.
- Thimann K.V., Skoog F.** (1933) Studies on the growth hormone of plants III. The inhibiting action of the growth substance on bud development. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 19:714-716.
- Thorpe T.A.** (2007) History of plant tissue culture. *Molecular Biotechnology* 37:169-180.
- Tian H., De Smet I., Ding Z.** (2014) Shaping a root system: regulating lateral versus primary root growth. *Trends in Plant Science* 19:426-431.
- Tinland B.** (1996) The integration of T-DNA into plant genomes. *Trends in Plant Science* 1:178-184.
- Topping J.F., Lindsey K.** (1997) Promoter trap markers differentiate structural and positional components of polar development in *Arabidopsis*. *The Plant Cell Online* 9:1713-1725.
- Topping J.F., Wei W., Lindsey K.** (1991) Functional tagging of regulatory elements in the plant genome. *Development* 112:1009-1019.
- Topping J.F., Agyeman F., Henricot B., Lindsey K.** (1994) Identification of molecular markers of embryogenesis in *Arabidopsis thaliana* by promoter trapping. *The Plant Journal* 5:895-903.
- Troncoso de Arce A., Matte C., Cantos M., Lavee S.** (1999) Evaluation of salt tolerance of *in vitro*-grown grapevine rootstock varieties. *Vitis* 38:55-60.
- Twell D., Yamaguchi J., McCORMICK S.** (1990) Pollen-specific gene expression in transgenic plants: coordinate regulation of two different tomato gene promoters during microsporogenesis. *Development* 109:705-713.
- Tyree M.T., Sperry J.S.** (1989) Vulnerability of xylem to cavitation and embolism. *Annual Review of Plant Biology* 40:19-36.
- Umali D.L.** (1993) Irrigation-induced salinity: a growing problem for development and the environment. World Bank Publications.
- United Nations D.o.E.a.S.A., Population Division.** (2011) World Population Prospects: The 2010 Revision.
- Vain P., Worland B., Thole V., McKenzie N., Alves S.C., Opanowicz M., Fish L.J., Bevan M.W., Snape J.W.** (2008) Agrobacterium-mediated transformation of the temperate grass *Brachypodium distachyon* (genotype Bd21) for T-DNA insertional mutagenesis. *Plant Biotechnology Journal* 6:236-245.
- Van den Dries N., Gianni S., Czerednik A., Krens F.A., de Klerk G.-J.M.** (2013) Flooding of the apoplast is a key factor in the development of hyperhydricity. *Journal of Experimental Botany* 64:5221-5230.
- Van der Biezen E.A., Brandwagt B.F., van Leeuwen W., Nijkamp H.J.J., Hille J.** (1996) Identification and isolation of the FEEBLY gene from tomato by transposon tagging. *Molecular and General Genetics* 251:267-280.
- Van Harten A.M.** (1998) Mutation breeding: theory and practical applications. Cambridge University Press, Cambridge, UK.
- Van Oosten M.J., Sharkhuu A., Batelli G., Bressan R.A., Maggio A.** (2013) The *Arabidopsis thaliana* mutant *air1* implicates SOS3 in the regulation of anthocyanins under salt stress. *Plant Molecular Biology* 83:405-415.
- Van Sluys M.-A., Tempe J., Fedoroff N.** (1987) Studies on the introduction and mobility of the maize Activator element in *Arabidopsis thaliana* and *Daucus carota*. The EMBO

- journal 6:3881.
- Vardhini B.V., Rao S.S.R.** (2003) Amelioration of osmotic stress by brassinosteroids on seed germination and seedling growth of three varieties of sorghum. *Plant Growth Regulation* 41:25-31.
- Vasil V., Hildebrandt A.** (1965) Differentiation of tobacco plants from single, isolated cells in microcultures. *Science* 150:889-892.
- Venema K., Belver A., Marín-Manzano M.C., Rodríguez-Rosales M.P., Donaire J.P.** (2003) A novel intracellular K⁺/H⁺ antiporter related to Na⁺/H⁺ antiporters is important for K⁺ ion homeostasis in plants. *Journal of Biological Chemistry* 278:22453-22459.
- Vernoux T., Wilson R.C., Seeley K.A., Reichheld J.-P., Muroy S., Brown S., Maughan S.C., Cobbett C.S., Van Montagu M., Inzé D., May M.J., Sung Z.R.** (2000) The ROOT MERISTEMLESS1/CADMIUM SENSITIVE2 gene defines a glutathione-dependent pathway involved in initiation and maintenance of cell division during postembryonic root development. *The Plant Cell* 12:97-109.
- Vert G.** (2008) Plant signaling: brassinosteroids, immunity and effectors are BAK! *Current Biology* 18:R963-R965.
- Vert G., Nemhauser J.L., Geldner N., Hong F., Chory J.** (2005) Molecular mechanisms of steroid hormone signaling in plants. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 21:177-201.
- Vickers C.E., Gershenzon J., Lerdau M.T., Loreto F.** (2009) A unified mechanism of action for volatile isoprenoids in plant abiotic stress. *Nature Chemical Biology* 5:283-291.
- Vij S., Tyagi A.K.** (2007) Emerging trends in the functional genomics of the abiotic stress response in crop plants. *Plant Biotechnology Journal* 5:361-380.
- Vogel J.T., Walter M.H., Giavalisco P., Lytovchenko A., Kohlen W., Charnikhova T., Simkin A.J., Goulet C., Strack D., Bouwmeester H.J.** (2010) SICCD7 controls strigolactone biosynthesis, shoot branching and mycorrhiza-induced apocarotenoid formation in tomato. *The Plant Journal* 61:300-311.
- Vogg G., Fischer S., Leide J., Emmanuel E., Jetter R., Levy A.A., Riederer M.** (2004) Tomato fruit cuticular waxes and their effects on transpiration barrier properties: functional characterization of a mutant deficient in a very-long-chain fatty acid β -ketoacyl-CoA synthase. *Journal of Experimental Botany* 55:1401-1410.
- Vollbrecht E., Sigmon B.** (2005) Amazing grass: developmental genetics of maize domestication. *Biochemical Society Transactions* 33:1502-1506.
- Vriet C., Russinova E., Reuzeau C.** (2012) Boosting crop yields with plant steroids. *The Plant Cell* 24:842-857.
- Wachsman G., Sparks E.E., Benfey P.N.** (2015) Genes and networks regulating root anatomy and architecture. *New Phytologist* 208:26-38.
- Waldie T., McCulloch H., Leyser O.** (2014) Strigolactones and the control of plant development: lessons from shoot branching. *The Plant Journal* 79:607-622.
- Walter J.M.** (1967) Hereditary resistance to disease in tomato. *Annual Review of Phytopathology* 5:131-160.
- Wang Y., Nii N.** (2000) Changes in chlorophyll, ribulose biphosphate carboxylase-oxygenase, glycine betaine content, photosynthesis and transpiration in *Amaranthus tricolor* leaves during salt stress. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology* 75:623-627.
- Wang W., Chen X.** (2004) HUA ENHANCER3 reveals a role for a cyclin-dependent protein kinase in the specification of floral organ identity in *Arabidopsis*. *Development* 131:3147-3156.
- Wang X., Chory J.** (2006) Brassinosteroids regulate dissociation of BKI1, a negative regulator

- of BRI1 signaling, from the plasma membrane. *Science* 313:1118-1122.
- Wang T.-W., Cosgrove D.J., Arteca R.N.** (1993) Brassinosteroid stimulation of hypocotyl elongation and wall relaxation in pakchoi (*Brassica chinensis* cv Lei-Choi). *Plant Physiology* 101:965-968.
- Wang S., Chang Y., Guo J., Chen J.G.** (2007) *Arabidopsis* Ovate Family Protein 1 is a transcriptional repressor that suppresses cell elongation. *The Plant Journal* 50:858-872.
- Wang Y., Jiang J., Zhao X., Liu G., Yang C., Zhan L.** (2006) A novel LEA gene from *Tamarix androssowii* confers drought tolerance in transgenic tobacco. *Plant Science* 171:655-662.
- Wang Z.-Y., Nakano T., Gendron J., He J., Chen M., Vafeados D., Yang Y., Fujioka S., Yoshida S., Asami T.** (2002) Nuclear-localized BZR1 mediates brassinosteroid-induced growth and feedback suppression of brassinosteroid biosynthesis. *Developmental Cell* 2:505-513.
- Webb K.J., Skøt L., Nicholson M.N., Jørgensen B., Mizen S.** (2000) *Mesorhizobium loti* increases root-specific expression of a calcium-binding protein homologue identified by promoter tagging in *Lotus japonicus*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 13:606-616.
- Weigel D., Ahn J.H., Blázquez M.A., Borevitz J.O., Christensen S.K., Fankhauser C., Ferrándiz C., Kardailsky I., Malancharuvil E.J., Neff M.M.** (2000) Activation tagging in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 122:1003-1014.
- Williams E.J., Bowles D.J.** (2004) Coexpression of neighboring genes in the genome of *Arabidopsis thaliana*. *Genome Research* 14:1060-1067.
- Winicov I.** (1996) Characterization of rice (*Oryza sativa* L.) plants regenerated from salt-tolerant cell lines. *Plant Science* 113:105-111.
- Wolf O., Munns R., Tonnet M.L., Jeschke W.D.** (1990) Concentrations and transport of solutes in xylem and phloem along the leaf axis of NaCl-treated *Hordeum vulgare*. *Journal of Experimental Botany* 41:1133-1141.
- Wolters H., Jürgens G.** (2009) Survival of the flexible: hormonal growth control and adaptation in plant development. *Nature Reviews Genetics* 10:305-317.
- Wolters A.M.A., Trindade L.M., Jacobsen E., Visser R.G.** (1998) Fluorescence *in situ* hybridization on extended DNA fibres as a tool to analyse complex T-DNA loci in potato. *The Plant Journal* 13:837-847.
- Wu S.-J., Ding L., Zhu J.-K.** (1996) SOS1, a genetic locus essential for salt tolerance and potassium acquisition. *The Plant Cell* 8:617-627.
- Wu C., Li X., Yuan W., Chen G., Kilian A., Li J., Xu C., Li X., Zhou D.-X., Wang S., Zhang Q.** (2003) Development of enhancer trap lines for functional analysis of the rice genome. *The Plant Journal* 35:418-427.
- Xiao H., Jiang N., Schaffner E., Stockinger E.J., van der Knaap E.** (2008) A retrotransposon-mediated gene duplication underlies morphological variation of tomato fruit. *Science* 319:1527-1530.
- Yamaguchi T., Blumwald E.** (2005) Developing salt-tolerant crop plants: challenges and opportunities. *Trends in Plant Science* 10:615-620.
- Yang Y., Peng H., Huang H., Wu J., Jia S., Huang D., Lu T.** (2004) Large-scale production of enhancer trapping lines for rice functional genomics. *Plant Science* 167:281-288.
- Yeo A., Yeo M., Flowers S., Flowers T.** (1990) Screening of rice (*Oryza sativa* L.) genotypes for physiological characters contributing to salinity resistance, and their relationship to overall performance. *Theoretical and Applied Genetics* 79:377-384.

- Yin Y., Vafeados D., Tao Y., Yoshida S., Asami T., Chory J.** (2005) A new class of transcription factors mediates brassinosteroid-regulated gene expression in *Arabidopsis*. *Cell* 120:249-259.
- Yin Y., Wang Z.-Y., Mora-Garcia S., Li J., Yoshida S., Asami T., Chory J.** (2002) BES1 accumulates in the nucleus in response to brassinosteroids to regulate gene expression and promote stem elongation. *Cell* 109:181-191.
- Yin Y., Cheong H., Friedrichsen D., Zhao Y., Hu J., Mora-Garcia S., Chory J.** (2002) A crucial role for the putative *Arabidopsis* topoisomerase VI in plant growth and development. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99:10191-10196.
- Yoder J.I.** (1990) Rapid proliferation of the maize transposable element Activator in transgenic tomato. *The Plant Cell Online* 2:723-730.
- Yoder J.I., Palys J., Alpert K., Lassner M.** (1988) Ac transposition in transgenic tomato plants. *Molecular and General Genetics* 213:291-296.
- Yokoi S., Quintero F.J., Cubero B., Ruiz M.T., Bressan R.A., Hasegawa P.M., Pardo J.M.** (2002) Differential expression and function of *Arabidopsis thaliana* NHX Na⁺/H⁺ antiporters in the salt stress response. *The Plant Journal* 30:529-539.
- Yokota T., Arima M., Takahashi N.** (1982) Castasterone, a new phytosterol with plant-hormone potency, from chestnut insect gall. *Tetrahedron Letters* 23:1275-1278.
- Yoo S.K., Chung K.S., Kim J., Lee J.H., Hong S.M., Yoo S.J., Yoo S.Y., Lee J.S., Ahn J.H.** (2005) CONSTANS activates SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CONSTANS1 through FLOWERING LOCUS T to promote flowering in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 139:770-778.
- Yu M.** (1982) The dwarf curly leaf tomato mutant. *Journal of Heredity* 73:470-472.
- Yu X., Li L., Zola J., Aluru M., Ye H., Foudree A., Guo H., Anderson S., Aluru S., Liu P.** (2011) A brassinosteroid transcriptional network revealed by genome-wide identification of BES1 target genes in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* 65:634-646.
- Zaenen I., Van Larebeke N., Teuchy H., Van Montagu M., Schell J.** (1974) Supercoiled circular DNA in crown-gall inducing *Agrobacterium* strains. *Journal of Molecular Biology* 86:109-127.
- Zambryski P., Joos H., Genetello C., Leemans J., Van Montagu M., Schell J.** (1983) Ti plasmid vector for the introduction of DNA into plant cells without alteration of their normal regeneration capacity. *The EMBO journal* 2:2143.
- Zamir D.** (2001) Improving plant breeding with exotic genetic libraries. *Nat Rev Genet* 2:983-989.
- Zeng H., Tang Q., Hua X.** (2010) *Arabidopsis* brassinosteroid mutants *det2-1* and *bin2-1* display altered salt tolerance. *Journal of Plant Growth Regulation* 29:44-52.
- Zhang H.-X., Blumwald E.** (2001) Transgenic salt-tolerant tomato plants accumulate salt in foliage but not in fruit. *Nature Biotechnology* 19:765-768.
- Zhang X., Zhang Z., Chen J., Chen Q., Wang X.-C., Huang R.** (2005) Expressing TERF1 in tobacco enhances drought tolerance and abscisic acid sensitivity during seedling development. *Planta* 222:494-501.
- Zhang Q., Su L.-J., Chen J.-W., Zeng X.-Q., Sun B.-Y., Peng C.-L.** (2012) The antioxidative role of anthocyanins in *Arabidopsis* under high-irradiance. *Biologia Plantarum* 56:97-104.
- Zhang Y., von Behrens I., Zimmermann R., Ludwig Y., Hey S., Hochholdinger F.** (2015) LATERAL ROOT PRIMORDIA 1 of maize acts as a transcriptional activator in auxin signalling downstream of the Aux/IAA gene rootless with undetectable meristem 1. *Journal of Experimental Botany* 66:3855-3863.
- Zhao Y., Christensen S.K., Fankhauser C., Cashman J.R., Cohen J.D., Weigel D., Chory J.**

- (2001) A role for flavin monooxygenase-like enzymes in auxin biosynthesis. *Science* 291:306-309.
- Zhao T., Palotta M., Langridge P., Prasad M., Graner A., Schulze-Lefert P., Koprek T.** (2006) Mapped Ds/T-DNA launch pads for functional genomics in barley. *The Plant Journal* 47:811-826.
- Zhou A., Wang H., Walker J.C., Li J.** (2004) BRL1, a leucine-rich repeat receptor-like protein kinase, is functionally redundant with BRI1 in regulating *Arabidopsis* brassinosteroid signaling. *The Plant Journal* 40:399-409.
- Zhu J.-K.** (2002) Salt and drought stress signal transduction in plants. *Annual Review of Plant Biology* 53:247.
- Zhu J.-K., Liu J., Xiong L.** (1998) Genetic analysis of salt tolerance in *Arabidopsis*: evidence for a critical role of potassium nutrition. *The Plant Cell* 10:1181-1191.
- Ziv M.** (1991) Vitrification: morphological and physiological disorders of *in vitro* plants, in: P. C. Debergh and R. H. Zimmerman (Eds.), *Micropropagation*, Springer Netherlands. pp. 45-69.
- Zou J., Zhang S., Zhang W., Li G., Chen Z., Zhai W., Zhao X., Pan X., Xie Q., Zhu L.** (2006) The rice HIGH-TILLERING DWARF1 encoding an ortholog of *Arabidopsis* MAX3 is required for negative regulation of the outgrowth of axillary buds. *The Plant Journal* 48:687-698.